



DOCTORADO EN NEUROCIENCIA UAM

Mecanismos moleculares y celulares implicados en la respuesta del sistema trigeminal periférico a alteraciones inducidas en la entrada sensorial

TESIS DOCTORAL

Autora: **Julia Fernández Montoya**

Director: Carlos Avendaño

Co-Directora: Pilar Negredo

Afiliación: *Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia, Facultad
de Medicina UAM, Madrid.*

Madrid, 22 de mayo de 2017



Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

Carlos Avendaño Trueba, Catedrático de Anatomía y Neurociencia y Pilar Negredo Madrigal, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

HACEN CONSTAR: Que Dña. Julia Fernández Montoya ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral “Mecanismos moleculares y celulares implicados en la respuesta del sistema trigeminal periférico a alteraciones inducidas en la entrada sensorial”, que ha terminado satisfactoriamente.

Revisado el presente trabajo, quedamos conformes con su presentación para ser juzgado.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, los firmamos en Madrid a 19 de Mayo de 2017.

Fdo. Carlos Avendaño Trueba

Fdo. Pilar Negredo Madrigal

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos BFU2012-39960 y BFU2015-66941R del Ministerio de Economía y Competitividad y del Fondo Europeo para el Desarrollo Regional (MINECO/FEDER).

RESUMEN/SUMMARY

La plasticidad dependiente de la experiencia sensorial es capaz de producir cambios duraderos en las estructuras cerebrales, tanto a nivel molecular como a nivel anatómico. Mientras que estos cambios se han estudiado de forma extensa en la corteza, se sabe poco sobre la participación de las estructuras periféricas en estos fenómenos plásticos. En este trabajo hemos estudiado la implicación de los aferentes primarios trigeminales en la plasticidad dependiente de entrada sensorial utilizando un modelo de recorte crónico repetido unilateral de las vibrisas y otro de exposición crónica a un ambiente enriquecido, en ratas macho adultas jóvenes. Hemos analizado los cambios morfométricos en las terminaciones axónicas en los núcleos troncoencefálicos tras inyección intraneural de dos trazadores, la subunidad B de la toxina colérica (CTB) y la isolectina B4 (IB4), que marcan respectivamente fibras mielínicas y amielínicas, y los cambios en la expresión de genes y proteínas relacionadas con la neurotransmisión glutamatérgica en el ganglio trigémino, lugar donde residen los somas de estas neuronas. Los resultados muestran que los aferentes primarios mantienen el patrón laminar y regional en sus terminaciones pero en las fibras marcadas con CTB que se distribuyen en todos los núcleos del trigémino se produce un aumento en el número y el tamaño de las varicosidades axónicas tras enriquecimiento ambiental. Cambios similares se observan tras la privación del tacto háptico por recorte de vibrisas, pero sólo en las láminas III-IV del subnúcleo caudal del trigémino. No se detectaron cambios en las fibras marcadas con IB4 tras las manipulaciones sostenidas de la entrada sensorial. En un intento de profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a estos cambios, demostramos la existencia de asimetrías en la expresión de genes codificantes para distintas subunidades de receptores de glutamato y moléculas relacionadas con estos receptores en los animales controles. Estas asimetrías aumentaron tras la exposición de las ratas al ambiente enriquecido mientras que el recorte crónico unilateral de vibrisas en el lado derecho prácticamente eliminó dichas diferencias de lado. Las manipulaciones de la entrada sensorial también produjeron cambios específicos de lado en la expresión proteica de las subunidades de los receptores de glutamato.

En resumen, la exposición prolongada a cambios en la entrada de información sensorial sin que se produzcan daños en la vía, induce cambios estructurales en los terminales primarios y modifica la expresión de genes y proteínas relacionados con la neurotransmisión glutamatérgica en el ganglio trigémino, poniendo de manifiesto la importancia de este nodo primario del procesamiento sensorial y su implicación como una de las estructuras más tempranas que participan en la plasticidad sináptica dependiente de la experiencia.

Changes in sensory input are capable to induce lasting changes in brain structures at both molecular and anatomical levels. Whilst relatively well studied in the cortex, little is known about the involvement of peripheral structures in these experience-dependent plastic phenomena. Whilst relatively well studied in the cortex, little is known about the involvement of peripheral structures in these plastic phenomena. In this work we have studied the participation of trigeminal primary afferents in input-dependent plasticity in young male adult rats using two models: chronic deprivation of haptic touch by unilateral whisker trimming, or long-term exposure to environmental enrichment. We have examined morphometric changes in central axonal terminations in brainstem trigeminal nuclei after intraneural injections of a mixture of cholera-toxin B (CTB) and isolectin B4 (IB4) -tracers for myelinated and unmyelinated fibers respectively-, and changes in expression of genes and protein related with glutamatergic neurotransmission in the trigeminal ganglion, where primary sensory neurons reside. Results showed that the regional and laminar pattern of terminal arborizations in the trigeminal nuclei of the brainstem remained substantially unchanged; however there were significant and widespread increases in the number and size of CTB-labeled varicosities in the enriched condition. Similar changes were observed in the whisker trimming condition, but only in laminae III-IV of the caudal division of the spinal nucleus. No obvious changes were detected in IB4-labeled terminals in laminae I-II after sensory input manipulation. In an attempt to advance our knowledge of the molecular mechanisms underlying these changes, we demonstrated the existence of asymmetries in the expression of genes that code for various glutamate receptor subunits and in the levels of proteins related with these receptors. Long-term exposure to sensory-enriched environment increased this left–right asymmetry in gene expression. Conversely, unilateral whisker trimming on the right side almost eliminated the mentioned asymmetries. The above manipulations also induced side-specific changes in the protein levels of glutamate receptor subunits.

In summary, sustained changes in sensory input without any neural damage induce structural modifications in primary afferent terminals and in genes and protein related with glutamatergic transmission expression in the trigeminal ganglion, highlighting the importance of this early sensory-processing node and its implication as one of the earliest players in sensory experience-dependent synaptic plasticity.

ABREVIATURAS

AMPA: α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AVP: Arginina vasopresina

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

C: Grupo control

CaMKII: Calcio-calmodulina kinasa II

CB1: Receptor cannabinoide de tipo 1

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc

CSF: Complejo seno-folículo

CTB: Fracción B de la toxina colérica

CyO: Citocromo oxidasa

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DVN: Nervio profundo de la vibrisa

E: Grupo enriquecido

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GAD: Descarboxilasa del ácido glutámico

GRIP1: Proteína de interacción con los receptores de glutamato

GTPasa: Enzima guanosina trifosfatasa

HRP: Peroxidasa de rábano

IB4: Isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia*

ICER: Represor temprano inducible por AMPc

IEGs: Genes de respuesta temprana

IoN: Nervio Infraorbitario

JunB: Jun-Kinasa B

Krox-24: Regulador transcripcional con dedos de cinc de unión al DNA

L: Lado izquierdo

LTD: Long Term Depression

LTP: Long Term Potentiation

Me5: Núcleo mesencefálico del trigémino

mGLUR: Receptor metabotrópico

Mo5: Núcleo motor del trigémino

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NMDA: N-metil-D-aspartato

NPTX2: Pentraxina neuronal 2

PB: Tampón fosfato

PBT: Tampón fosfato con tritón

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PICK1: Proteína que interacciona con la proteína kinasa C

PKA: Proteína kinasa A

Pr5: Núcleo sensorial principal del trigémino

R: Lado derecho

RhoA: Homólogo A de la familia de proto-oncogenes Ras

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa

SGCs: Células de la glia satélite

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

Sp5: Núcleo sensorial espinal del trigémino

Sp5c: Porción caudal del núcleo espinal del trigémino

Sp5ip/Sp5i: Porción interpolar del núcleo espinal del trigémino

Sp5o: Porción oral del núcleo espinal del trigémino

Su5: Núcleo supratrigeminal

SVN: Nervio superficial de la vibrisa

T: Grupo con recorte de vibrisas

TG: Ganglio Trigémino

V: Nervio trigémino o quinto par craneal

V1: Rama oftálmica del nervio trigémino

V2: Rama maxilar del nervio trigémino

V3: Rama mandibular del nervio trigémino

WB: Western blot

WGA: Aglutinina de germen de trigo

ÍNDICE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN/SUMMARY | I |
| ABREVIATURAS..... | V |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Sobre el concepto de “plasticidad” | 3 |
| Bases neurales de la plasticidad dependiente de la entrada sensorial | 4 |
| Modelos de modificación de la entrada sensorial en roedores..... | 7 |
| Modificaciones negativas..... | 8 |
| Modificaciones positivas | 12 |
| El sistema trigeminal de la rata | 14 |
| La almohadilla de vibrisas | 15 |
| El complejo seno-folículo (CSF) | 16 |
| El ganglio trigémino..... | 19 |
| Sistema trigeminal: visión de conjunto | 22 |
| Complejo Nuclear Sensorial Trigeminal | 28 |
| Sistema glutamatérgico y plasticidad..... | 32 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 37 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 41 |
| Animales de experimentación y grupos..... | 43 |
| Manejo de los animales de experimentación | 43 |
| Amansamiento (“handling”)..... | 43 |
| Recorte de vibrisas | 44 |
| Ambiente enriquecido..... | 45 |
| Cirugías y procedimientos invasivos | 45 |
| Inyección de trazadores en el nervio profundo de la vibrisa C1 | 45 |
| Control de peso de los animales | 46 |
| Sacrificio de los animales | 47 |
| Experimentos de trazado | 47 |
| Experimentos de Western blot y de análisis génico | 47 |
| Procesamiento del tejido | 48 |
| Microtomía y recogida del tejido | 48 |
| Extracción de RNA..... | 48 |
| Extracción de proteínas..... | 49 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Inmunohistoquímica | 49 |
| Microarray | 51 |
| Western blot..... | 52 |
| Estereología..... | 52 |
| Identificación de varicosidades | 52 |
| Mediciones estereológicas..... | 53 |
| Análisis de datos..... | 55 |
| Western blot..... | 55 |
| Microarray | 55 |
| Estereología..... | 56 |
| RESULTADOS | 59 |
| Inervación terminal en los núcleos del trigémino de los aferentes del DVN de C1 en animales controles..... | 61 |
| Captación y colocación de los trazadores | 61 |
| Patrones de inervación nuclear en controles..... | 65 |
| Cambios en la inervación terminal de los aferentes primarios de una única vibrisa tras modificaciones de la entrada sensorial..... | 68 |
| Patrón de inervación terminal en los núcleos del trigémino tras enriquecimiento y recorte de vibrisas..... | 68 |
| Tamaño de las varicosidades..... | 73 |
| Cambios en las bases moleculares de la transmisión glutamatérgica en el ganglio trigémino tras modificaciones en la entrada sensorial..... | 76 |
| Cambios a nivel génico | 76 |
| Expresión de genes relacionados con plasticidad sináptica..... | 76 |
| Expresión de mRNA de genes relacionados con la transmisión glutamatérgica en el ganglio del trigémino | 84 |
| Cambios en los niveles de proteínas relacionados con la plasticidad glutamatérgica | 86 |
| DISCUSIÓN..... | 93 |
| Generalidades de resultados principales y del modelo elegido | 95 |
| Limitaciones metodológicas..... | 97 |
| Animales de experimentación..... | 97 |
| Inyección del trazador..... | 97 |
| Elección de CTB e IB4 | 99 |
| Identificación y recuento de varicosidades..... | 99 |
| Limitaciones de las técnicas moleculares..... | 100 |
| Localización celular de las moléculas diana | 100 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Asimetrías de lado en la expresión de genes y en los niveles de proteínas | 101 |
| Efectos de la privación del tacto háptico por recorte de vibrisas..... | 103 |
| En las terminaciones de los aferentes primarios | 103 |
| En los receptores de glutamato del TG | 105 |
| Efectos de la exposición al enriquecimiento ambiental | 108 |
| En las terminaciones de los aferentes primarios | 108 |
| En los receptores de glutamato del TG | 110 |
| Efectos de la alteración de la entrada sensorial en la inervación dual de Sp5c | 112 |
| Consideraciones finales..... | 113 |
| CONCLUSIONES | 115 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 119 |

INTRODUCCIÓN

Sobre el concepto de “plasticidad”

El término “plasticidad” se viene utilizando desde hace ya más de un siglo pero en la actualidad se ha usado de forma demasiado metafórica y probablemente no siempre correcta. Es importante aclarar que para poder hablar de plasticidad han de producirse dos hechos fundamentales: el primero es que tienen que existir cambios estructurales duraderos identificables en el sistema y el segundo es que estos cambios tiene que producir modificaciones observables en el comportamiento (Will et al., 2008). De acuerdo con esto, la plasticidad neural debe entenderse como la capacidad del sistema nervioso de realizar modificaciones duraderas en su conectividad bajo la influencia del ambiente que den lugar a cambios en su estructura anatómica y en su función. Esta capacidad de cambio incluye a todos los integrantes del sistema y no sólo a las neuronas, por ello habrá que tener en cuenta la participación de otros componentes, tanto del sistema nervioso central (SNC) como del sistema nervioso periférico (SNP), como por ejemplo las células gliales y los vasos sanguíneos. Este mecanismo hace que el cerebro pueda adaptarse de la forma más eficaz posible a nuevas experiencias, modificaciones ambientales, cambios fisiológicos y lesiones. La plasticidad puede entenderse como uno de los principales mecanismos de adaptación del sistema nervioso. Está presente a lo largo de todas las etapas de la vida, aunque se va modificando y disminuye en individuos adultos. Hay plasticidad durante el desarrollo, en el aprendizaje, en la memoria y esta, es determinante, en la respuesta del cerebro al daño y a la enfermedad.

El término plasticidad fue utilizado por primera vez en 1890 por William James para describir la susceptibilidad que tiene el comportamiento humano de ser modificado (James, 1890). Contemporáneamente, Tanzi y Lugaro identificaron por primera vez lo que más tarde recibiría el nombre de sinapsis y asociaron la plasticidad a cambios en estas estructuras (Berlucchi y Buchtel, 2009). Más adelante, Santiago Ramón y Cajal pensó que la morfología del sistema nervioso podía verse modificada gracias al “ejercicio cerebral” (Ramón y Cajal, 1904) y que esta podría ser la base anatómica capaz de modificar el comportamiento (Ramón y Cajal, 1914). Sin embargo, tras la muerte de Ramón y Cajal, los investigadores adoptaron una visión bastante rígida en lo concerniente a la capacidad de cambio del sistema nervioso central, y se asumió que una vez que se terminaba el periodo de desarrollo la anatomía del SNC se mantenía invariable. No fue hasta más adelante, con los experimentos de Liu y Chambers, cuando esta opinión comenzó a cambiar. Ellos demostraron, en experimentos realizados con gatos, que tras la denervación parcial del asta

dorsal de la médula espinal se producía un notable incremento en los axones de las fibras que quedaban intactas (Liu y Chambers, 1958).

Bases neurales de la plasticidad dependiente de la entrada sensorial

En nuestro caso, en particular, nos centraremos en el estudio de la plasticidad dependiente de la entrada sensorial. Se sabe que la experiencia sensorial es capaz de modificar el sistema nervioso y de producir nuevas memorias, para lo cual es necesaria la existencia de plasticidad. La modificación de las estructuras sinápticas es uno de los procesos clave de la plasticidad y nos va a permitir relacionar los cambios estructurales con los cambios funcionales. Por un lado, la comprensión de cómo la experiencia es capaz de inducir plasticidad sentará las bases para poder entender los procesos de aprendizaje y memoria, y por otro lado, comprender cómo el daño al sistema nervioso induce plasticidad podrá ayudarnos en el desarrollo de mejores terapias e incluso nos permitirá actuar para poder aumentar la limitada capacidad de reparación que presenta este sistema.

Gracias a los estudios de Hubel y Wiesel, se descubrió que no era necesario lesionar la vía de entrada de la información sensorial para producir modificaciones en el sistema nervioso, sobre todo en lo concerniente a campos receptores y mapas de representación cortical. En sus experimentos se demostró que tras suturar los párpados de un ojo a cachorros de gatos, la corteza visual dejaba de responder a la estimulación de ese ojo (Wiesel y Hubel, 1963). Estos cambios tenían un periodo de susceptibilidad, siendo más pronunciados en los dos primeros meses de vida y desapareciendo al final del tercer mes (Hubel y Wiesel, 1970). Los cambios anatómicos en el sistema visual por disminución de la entrada de información sensorial, se demostraron cuando se observó que ratones criados en oscuridad tenían menor número de espinas en las dendritas apicales de las neuronas de la capa V (Ruiz-Marcos y Valverde, 1969; Valverde, 1967; Valverde y Ruiz-Marcos, 1969). Estos estudios, junto con los de Van der Loos y Woolsey, en los que se describió que la desaferentización (por cauterización de las vibrisas) justo después del nacimiento producía alteraciones en la formación de los barriles corticales (Van der Loos y Woolsey, 1973) pusieron de manifiesto la existencia de unos periodos críticos. Durante estos periodos, las modificaciones inducidas por los cambios en la entrada sensorial son mucho más evidentes que en etapas posteriores.

A pesar de ello, el cerebro adulto mantiene la capacidad de modificarse en respuesta a cambios en la entrada sensorial. Lesiones periféricas en monos adultos demostraron que el sistema somatosensorial mostraban una gran plasticidad en los mapas de representación, la lesión de un dedo de la mano producía cambios rápidos en su representación cortical, de manera que ahora esa parte de la corteza respondía a los dedos

adyacentes intactos (Merzenich et al., 1983a; Merzenich et al., 1983b; Wall et al., 1983). También se han descrito cambios en regiones subcorticales en respuesta a desaferentización, como es el caso del tálamo (Shin et al., 1995), la médula espinal (Devor y Wall, 1978) y los núcleos del cordón posterior (McMahon y Wall, 1983). En el tálamo (VPL) y en el núcleo grácil también se observó que la anestesia local de regiones periféricas como la cara o las patas, inducía una rápida reorganización en los campos receptivos (Panetsos et al., 1995; Shin et al., 1995).

Se cree que estos cambios rápidos pueden deberse a fenómenos de activación de fibras que en condiciones normales no son funcionales y que se activan en respuesta a una lesión, cuando las que normalmente transmitían esa información dejan de funcionar (Wall, 1977). Las conexiones silentes se activan a través de modificaciones locales en la fuerza sináptica para activar neuronas que previamente no respondían a ese tipo de información (Kaas et al., 1999). Aún así, estos mecanismos no parecen suficientes para explicar las grandes reorganizaciones que se producen en los mapas somatosensoriales de la corteza en respuesta a la desaferentización crónica. Parece ser que estos cambios, junto con la reactivación de estas zonas en respuestas a regiones periféricas adyacentes, se deben al crecimiento de nuevas conexiones. A este respecto se han acumulado numerosa evidencias sobre la existencia de crecimiento de nuevos brotes axónicos, no sólo a nivel cortical sino también en regiones subcorticales en el sistema somestésico (Florence y Kaas, 1995; Garraghty y Kaas, 1991; Kaas et al., 1999; Sengelaub et al., 1997). Casos similares se han observado en la corteza visual de gatos y monos tras lesiones focales binoculares en la retina (Darian-Smith y Gilbert, 1995).

En nuestro laboratorio, hemos demostrado que el recorte crónico de todas vibrisas de un lado produce un incremento en la densidad de superficie de sinapsis asimétricas, en las capas I y II, y en la densidad sináptica de perfiles excitatorios en la capa I (Machín et al., 2006). Además, hemos puesto de manifiesto que este tipo de modificaciones no sólo se producen a nivel cortical, sino que los cambios pueden detectarse ya en los primeros niveles de la vía somatosensorial. Las neuronas de segundo orden de la vía trigeminal sufren cambios morfométricos tras manipulación de la entrada sensorial, así las neuronas barrilete del núcleo principal (Pr5) mostraron un alargamiento moderado de los árboles dendríticos ipsilaterales a la privación (Negredo et al., 2009) y en las neuronas intersubnucleares del núcleo espinal (Sp5c) el número de espinas dendríticas se redujo tras el recorte de bigotes (Martin et al., 2014). Por primera vez también hemos demostrado cambios en la expresión de genes relacionados con la transmisión glutamatérgica tras privación crónica del tacto activo, observando un aumento en la expresión de algunos receptores de glutamato (AMPA, NMDA y metabotrópicos) en el ganglio trigémino (TG) del lado privado (Fernández-Montoya et al., 2016).

Prácticamente al mismo tiempo que se descubría que las lesiones por denervación (Liu y Chambers, 1958) y la disminución de la entrada sensorial eran capaces de modificar el sistema nervioso (Ruiz-Marcos y Valverde, 1969; Valverde, 1967; Valverde y Ruiz-Marcos, 1969; Wiesel y Hubel, 1963), se demostraba que el incremento de la entrada sensorial también podían cambiar distintas características anatómicas y fisiológicas del sistema nervioso.

El aumento de estimulación sensorial puede realizarse de diversas formas, una de ellas es la estimulación pasiva que de manera artificial se puede imponer a una vibrisa durante horas o días. Este tipo de manipulación produjo una disminución en la representación cortical de ese bigote, un incremento en la expresión de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en la capa IV de la corteza de barriles, (Gierdalski et al., 2001; Welker et al., 1989) y en la densidad de espinas que reciben sinapsis tanto inhibitorias como excitatorias, en el barril cortical correspondiente a la vibrisa estimulada (Knott et al., 2002). Sin embargo, estos efectos son transitorios y la interpretación de sus resultados se complica, teniendo en cuenta que este tipo de experiencia sensorial está alejada de la que de forma natural puede recibir los roedores. Es por este motivo que se ha utilizado otra forma de estimular la entrada sensorial exponiendo a los animales a un ambiente enriquecido en el que la estimulación no es forzada y además se corresponde con una situación más natural. Ya en 1949, Donald Hebb observó que ratas que se habían criado libremente en su casa eran más hábiles a la hora de resolver problemas (laberintos) que las que habían crecido en jaulas de laboratorio, y esto se debía a modificaciones en el cerebro (Hebb, 1949). Más adelante en la Universidad de Berkeley, Rosenzweig, Bennet y Diamond demostraron que la exposición de ratas adultas a diferentes ambientes enriquecidos y entrenamientos determinaba la aparición de cambios en el cerebro. Se observaron aumentos en el grosor cortical (Diamond et al., 1964), el tamaño del soma y del núcleo de las células nerviosas (Diamond, 1988), tamaño de las dendritas (Greenough et al., 1973; Holloway, 1966), espinas dendríticas, y tamaño y número de la sinapsis (Black et al., 1990; Mollgaard et al., 1971), número de células gliales y tamaño de los capilares sanguíneos (Diamond, 1988). Acompañando a estos cambios morfológico se observaron también cambios químicos como: un aumento en proteína total, en el ratio RNA/DNA, en el ratio colinesterasa/acetilcolina, en el mRNA del factor de crecimiento nervioso (NGF), AMP cíclico, acetil-colintransferasa, poliaminas corticales, receptores NMDA, hexokinasa, etc. (Diamond, 2001).

Los cambios estructurales debidos a este tipo de exposición son complejos y dependen de múltiples variables que se comentarán en el siguiente apartado (ver Modificaciones positivas). La mayoría de los estudios sobre enriquecimiento se han centrado en la corteza, se ha visto que la densidad de espinas dendríticas en pirámides corticales se incrementa en ratas macho si el enriquecimiento lo experimentan como adultas jóvenes o viejas, pero disminuye si son expuestas antes de cumplir 1 mes de vida; y los

cambios son más variables y dependientes del tipo de dendritas en las hembras (Kolb et al., 2003). También se han observado cambios en las interneuronas corticales, en las que se produjo un aumento de c-Fos tras exposición a un ambiente enriquecido (Staiger et al., 2002). Más recientemente, estudios ultraestructurales han confirmado un incremento de sinapsis tanto excitatorias como inhibitorias en la capa IV tras enriquecimiento (Landers et al., 2011).

Los estudios realizados en nuestro laboratorio apuntan a que el enriquecimiento ambiental en animales adultos jóvenes es capaz de afectar a toda la vía de procesamiento somatosensorial. De este modo, se han demostrado cambios en la expresión de una serie de receptores de glutamato en las neuronas primarias en el ganglio del trigémino tras enriquecimiento (Fernández-Montoya et al., 2016), y también en las neuronas de proyección del núcleo principal del trigémino que presentan una mayor longitud y más ramificaciones en sus dendritas (Negredo et al., 2009). El enriquecimiento o el entrenamiento produce también facilitación del procesamiento sensorial en las regiones afectadas de la corteza, con expansión de las mismas (Guic et al., 2008; Rema et al., 2006).

Esta variedad de cambios estructurales y funcionales está acompañada de grandes cambios en los mecanismos de señalización molecular asociados al procesamiento de las señales procedentes del entorno. En un análisis extenso de toda la corteza de ratones adultos 2 meses después de su exposición al ambiente enriquecido, se encontró que 100 transcritos, muchos de los cuales estaban relacionados con la transmisión sináptica y la estructura neuronal, habían cambiado al menos en 1,5 su ratio de expresión (Rampon et al., 2000). También, tras un breve periodo de exposición a un ambiente enriquecido, el factor neurotrófico del cerebro (BDNF) y otros genes de respuesta temprana (IEGs) se encontraron sobreexpresados en la corteza de barriles de estas ratas (Bisler et al., 2002; Staiger, 2006; Valles et al., 2011).

Modelos de modificación de la entrada sensorial en roedores

El sistema nervioso no está aislado ni es inmutable. Su funcionamiento sólo puede comprenderse de forma completa cuando se estudia su interacción con el entorno, que a su vez es capaz de influir sobre el cerebro y modificarlo. Los sistemas sensoriales, son la principal vía de entrada de información del entorno en el cerebro y es por ello que juegan un papel fundamental en modelar la estructura del sistema nervioso, además se pueden manipular de formas más o menos sencilla por lo que se han estudiado en gran medida para conocer los mecanismos de la plasticidad cerebral.

Estos fenómenos de plasticidad pueden producirse en respuesta a cambios diversos en la entrada sensorial. De forma general los clasificaremos en: “modificaciones negativas”,

aquellas que están destinadas a eliminar o a reducir la entrada de información sensorial; y, “modificaciones positivas”, que consisten en aumentar la entrada de información sensorial.

Modificaciones negativas

La eliminación o disminución de la entrada sensorial es lo que se entiende como una modificación negativa del entorno. Este tipo de manipulación se puede llevar a cabo de forma invasiva, lesionando los receptores sensoriales o interrumpiendo la vía aferente, o sólo eliminando la información sensorial de forma total o parcial sin producir daño, por ejemplo, recortando las vibrisas de los roedores en el caso del sistema somatosensorial, tapando uno o los dos ojos, en el sistema visual, o taponando los oídos en el sistema auditivo.

En este trabajo, centraremos el interés en el sistema trigeminal que ha sido extensamente utilizado para estudiar la plasticidad estructural y funcional dependiente de aferentes neurales. La alteración de la entrada de información sensorial en este sistema puede obtenerse de múltiples formas, desde las más invasivas: transección o aplastamiento de alguna de las ramas del nervio trigémino (en especial el nervio infraorbitario), destrucción selectiva de fascículos, destrucción de folículos de las vibrisas principales, etc., hasta las menos: extirpación cuidadosa de las vibrisas o recorte de las mismas. Es esta última forma de privación la que más nos interesa, ya que se puede alterar la entrada de información sensorial sin causar ningún tipo de daño en la vía neural. Este hecho es importante debido a que las lesiones producen de por sí degeneración nerviosa y pueden llevar a la generación de hipoestesias, parestesias o dolor, hechos que de forma particular están influyendo en la plasticidad. Además, este tipo de lesiones producen una eliminación de la totalidad de la modalidad sensorial, mientras que con el recorte de vibrisas se eliminan sólo ciertos aspectos de la experiencia sensitiva. Estos aspectos se conocen como tacto activo o háptico, y tiene como objetivo la búsqueda activa, intencional de información (Diamond y Arabzadeh, 2013). Para realizar este tipo de comportamiento exploratorio y discriminativo, los roedores son capaces de controlar sus vibrisas y de modificar sus movimientos para obtener la mayor información posible dependiendo de la tarea que están realizando (Ahissar y Arieli, 2001; Ahissar y Knutsen, 2008).

Existen muchos tipos distintos de patrones de privación por recorte de vibrisas y cada uno de ellos es capaz de inducir cambios específicos. Los más utilizados para estudiar la privación en el sistema somatosensorial han sido: dejar una única vibrisa sin cortar, dejar dos vibrisas adyacentes intactas, dejar una fila de vibrisas, eliminar una única fila o el patrón en tablero de ajedrez que consiste en eliminar una sí y una no. A continuación trataremos de resumir los hechos más relevantes que se han descrito utilizando los distintos paradigmas.

Los primeros estudios en la corteza de barriles se realizaron dejando una vibrisa intacta y extirpando el resto, y se observó una expansión del área cortical que representaba

la vibrisa intacta (Kossut y Hand, 1984). También se demostró que sólo el recorte de los bigotes era suficiente para alterar estos campos receptivos (Simons y Land, 1987). Más tarde se demostró que la privación por recorte de bigotes producía plasticidad sináptica en la capa IV y en las capas II/III de la corteza de barriles y que la primera disminuía con la edad mientras que la última se mantenía en los animales adultos (Fox, 1992).

En general, en todos los paradigmas de privación, se produce una potenciación de la respuesta de las vibrisas intactas y una disminución de la respuesta de las vibrisas privadas (Fox, 2008), apareciendo la depresión en un periodo de tiempo más corto que la potenciación (Glazewski y Fox, 1996). Sin embargo, se ha visto que este fenómeno se puede acelerar al utilizar el paradigma en tablero de ajedrez (Wallace y Fox, 1999). La localización de la potenciación también depende del tipo de patrón de privación. Cuando se dejan intactos dos bigotes adyacentes, la respuesta aumenta en el barril del bigote adyacente intacto (Diamond et al., 1993), mientras que cuando sólo se deja un bigote el aumento se produce en el barril adyacente que en este caso está privado (Fox, 1992; Glazewski y Fox, 1996).

La distancia entre los barriles corticales activos e inactivos es importante a la hora de determinar el grado de plasticidad (Wallace y Fox, 1999). En la corteza de barriles, tanto la potenciación como la depresión disminuyen según aumenta la distancia desde la columna del bigote intacto (Glazewski y Fox, 1996). Estos resultados apuntan a la existencia de un mecanismo de competición entre la información sensitiva. Se ha visto de hecho, que cuando se recortan todos los bigotes la depresión de las respuestas en las capas II/III es mucho menor que cuando sólo se priva un único bigote (Glazewski et al., 1998a) o cuando la privación se realiza en tablero de ajedrez (Wallace y Fox, 1999).

Parece ser que las respuestas de depresión se deben a la inducción de Depresión a Largo Plazo (LTD, *long term depression*) en las sinapsis excitatorias intracorticales que se establecen en las neuronas piramidales de las capas IV y II/III, que es donde se produce más depresión (Glazewski y Fox, 1996). La LTD está mediada por la entrada moderada y lenta de Ca^{2+} a través de receptores postsinápticos de NMDA. Esta entrada produce a su vez la activación de proteínas fosfatasa que desfosforilan receptores AMPA produciendo su internalización y la disminución de la eficacia sináptica (revisado en Luscher y Malenka, 2012). Se cree que en la LTD que se produce cuando hay depresión de respuestas también participan receptores CB1, en este caso la entrada de Ca^{2+} postsináptico y la activación de receptores mGLUR1 media la síntesis de endocannabinoides, que por señalización retrógrada se unen a receptores CB1 presinápticos disminuyendo la probabilidad de liberación de neurotransmisor en el terminal presináptico (Castillo, 2012; Feldman, 2009). Además se ha visto que la LTD que se produce en estas conexiones está ocluida tanto en ratas como en ratones sometidos a privación, es específica de columna y está impulsada en

parte por la competencia que se establece entre vibrisas activas e inactivas (Allen et al., 2003).

Se ha visto que las regiones septales que se encuentran entre los bordes de los barriles están implicadas en los mecanismos de potenciación (Fox, 1994). Experimentos de Potenciación a largo Plazo (LTP, *Long Term Potentiation*) por estimulación de alta frecuencia han demostrado que si se colocan los electrodos en las zonas de los septos en la capa IV es más fácil producir LTP en las capas superficiales que si estos se colocan en el centro de los barriles (Glazewski et al., 1998b). La potenciación de estas sinapsis parece estar mediada por LTP dependiente de receptores NMDA (Feldman, 2009). Durante este fenómeno la neurona presináptica y la neurona postsináptica están activas al mismo tiempo, lo que permite el desbloqueo de los receptores NMDA y una entrada máxima de calcio en la neurona postsináptica que media la activación de cascadas intracelulares responsables del aumento en la eficacia sináptica y relacionada con los fenómenos de potenciación (revisado en Luscher y Malenka, 2012). Por lo tanto el hecho de que pueda inducirse la LTP en estas vías de transmisión horizontal indica que podrían ser uno de los posibles sustratos de la potenciación en los fenómenos de plasticidad dependiente de la experiencia. Además, también se ha demostrado una disminución de los circuitos inhibitorios locales con una regulación a la baja del neurotransmisor GABA o de su enzima sintetizadora, GAD, en la capa IV de la corteza de barriles (Gierdalski et al., 1999; Land et al., 1995; Micheva y Beaulieu, 1995).

También se han encontrado fenómenos estructurales positivos tras desaferentización o ablación de los folículos de las vibrisas. Por ejemplo, se observó un incremento en el número y tamaño de las espinas dendríticas en la capa IV del campo de barriles ipsilateral tras un recorte crónico unilateral de vibrisas (Vees et al., 1998), además, Kossut y Juliano vieron que las neuronas del barril cortical que responde a una vibrisa intacta extienden sus axones más lejos que las de las neuronas de los barriles desaferentizados (Kossut y Juliano, 1999). Más recientemente se demostró que las neuronas de los barriles de las capas III y IV envían dendritas en todas las direcciones, perdiendo su orientación característica hacia el centro del barril, 8 semanas después de la ablación del folículo y sin que se modifique la densidad de espinas ni la longitud dendrítica (Tailby et al., 2005). La privación impide también la eliminación de espinas que tiene lugar de forma fisiológica en la capa I de la corteza a lo largo de toda la vida (Zuo et al., 2005) y puede afectar a la dinámica de las espinas dendríticas. La privación de los bigotes en patrón de ajedrez es capaz de aumentar la tasa de recambio de las espinas (Holtmaat et al., 2005; Trachtenberg et al., 2002). Se ha visto que la eliminación de varias filas de vibrisas produce una invasión de la representación de los bigotes conservados hacia las zonas privadas, acompañada de la adición de nuevas espinas en las neuronas piramidales de las capas II/III (Schubert et al., 2013).

Estos cambios plásticos observados tras la privación sensorial se acompañan de cambios moleculares subyacentes. Se sabe que los receptores NMDA están implicados en los cambios inducidos por recorte de vibrisas, ya que si se bloquean, estos cambios no se producen (Rema et al., 1998; Wall, 1977). Otra molécula implicada en este tipo de cambios es la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII), una proteína postsináptica que se activa por unión a la calcio-calmodulina se autofosforila y se vuelve independiente del calcio lo que hace que sea funcional por un periodo de tiempo más largo. En paradigmas de vibrisa intacta, en los que se recortan todas las vibrisas menos una, se ha visto que si el gen de esta enzima no es funcional, no se produce potenciación de la vibrisa intacta en las capas II/III de la corteza de barriles (Glazewski et al., 1996). Mutaciones puntuales que inhiben la autofosforilación de la CaMKII, son suficientes para impedir la plasticidad dependiente de entrada sensorial en la corteza de barriles (Glazewski et al., 2000). La proteína quinasa A (PKA) también se ha relacionado con la plasticidad tras privación por recorte de bigotes, afectando a la LTP cuando es inhibida (Fox, 2008). Se cree que estas dos kinasas actúan regulando a la subunidad GLUR1 del receptor de AMPA (Barria et al., 1997; Hardingham y Fox, 2006; Hayashi et al., 2000). Esta subunidad contiene sitios de fosforilación para ambas kinasas y puede controlar de forma directa la transmisión en las sinapsis glutamatérgicas.

Además, la expresión de genes puede activarse en las fases tardías de la plasticidad y se piensa que los cambios en la regulación génica son la base de los cambios estructurales. Se ha demostrado que hay un número importante de genes que se activa tras aplicar diversos patrones de privación. Por ejemplo, c-Fos, el represor temprano inducible por AMP cíclico (ICER), Krox-24 y JunB se activan en los barriles de los bigotes activos de animales privados tras ser expuestos a un ambiente enriquecido (Bisler et al., 2002). Esto sucede de forma similar con otro gen, la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB) (Barth et al., 2000).

Cuando CREB es fosforilado por acción de la PKA dimeriza, se transloca al núcleo y regula la transcripción. La regulación génica puede activarse a través del calcio por activación de la PKA, por ejemplo el que entra a través de los receptores NMDA. La implicación de CREB en la plasticidad de fase tardía se ha sugerido porque se ha visto que este gen está relacionado con las fases avanzadas de la LTP y la memoria (Bourtchuladze et al., 1994). De hecho, se descubrió que ratones que no tenían el gen de CREB mostraban la mitad de potenciación en los barriles activados que los ratones controles tras privación (Glazewski et al., 1999) y, animales adultos en los que sólo se había dejado un bigote intacto, mostraron una regulación a la alta de la transcripción mediada por CREB en la capa IV del barril correspondiente al bigote intacto que persistía durante una semana (Barth et al., 2000).

Modificaciones positivas

La estabulación de los animales de laboratorio se realiza en un entorno que presenta un déficit en la entrada sensorial, si se compara con el ambiente natural en el que viven los roedores. Es por ello que el estudio de los cambios en el cerebro producidos por una manipulación positiva del entorno ha sido el objetivo de numerosos grupos de investigación. La manera de actuar positivamente sobre el entorno ha sido exponer a los animales a ambientes que se conocen como “enriquecidos” o ambientes complejos.

Este tipo de ambientes consisten en jaulas de mayor tamaño que las que se utilizan de forma estándar, en las que se alojan grupos de animales numerosos para establecer relaciones sociales complejas, y que tienen en su interior objetos que pueden ser usados como guaridas, túneles y juguetes de diverso tipo que inciten a los animales a una actividad física voluntaria y a realizar comportamientos naturales como la búsqueda de alimento. Algunos autores son más partidarios de llamar a este ambiente “entorno complejo” aduciendo al hecho de que este ambiente no está enriquecido si lo comparamos con el ambiente natural del que podrecen los animales silvestres (Grossman et al., 2002). Utilizando este tipo de paradigma se demostró en los años 60, que ratas que habían estado en este tipo de entornos no sólo tenían cambios en su comportamiento sino que también tenían aumentada la enzima acetilcolinesterasa (Krech et al., 1960).

Los dos componentes fundamentales de un entorno enriquecido son la socialización y los juguetes, la combinación de la interacción social junto con la exposición a objetos nuevos son necesarias para que se produzca enriquecimiento (Krech et al., 1960). Además, para planificar un estudio que implique la utilización de un ambiente enriquecido, hay una serie de variables a tener en cuenta, ésta fueron clasificadas como dependientes e independientes (Diamond, 2001).

Las variables independientes son las características intrínsecas de los animales de experimentación elegidos para el estudio como la raza, el sexo, la edad y otros componentes genéticos que podrían influir en los resultados del experimento. Se ha demostrado que el enriquecimiento es capaz de modificar de forma positiva distintos aspectos de la estructura de la corteza a cualquier edad de los animales, incluido animales muy viejos, pero hay que tener en cuenta que la cantidad de cambios varía con la edad (Diamond, 2001). Normalmente se utilizan machos para este tipo de experimento para evitar la influencia de cambios debidos al ciclo estral. Además, se demostró que los cambios que se producían en la corteza en animales sometidos a las mismas condiciones de enriquecimiento eran distintos en machos y hembras (Diamond, 1988).

Las variables dependientes son aquellas que el experimentador tiene que fijar a la hora de diseñar el tipo de ambiente enriquecido como la duración del experimento, el tipo de

entorno, la actividad física y el estrés al que se va a someter a los animales de experimentación.

Duración y patrón temporal de la exposición

La exposición de ratas adultas jóvenes a un ambiente enriquecido durante 30 días produjo cambios en el cerebro, observándose un aumento en el grosor de las cortezas frontal, parietal y occipital. Este crecimiento es debido a un aumento del tamaño de las neuronas, número y longitud de sus dendritas y de sus espinas, y tamaño de las densidades postsinápticas (Diamond et al., 1964). Prolongar la duración de la exposición hasta los 80 días no dio lugar a un mayor incremento sino que en numerosas ocasiones produjo una disminución.

Se realizaron experimentos para establecer cuál es la duración óptima del periodo de enriquecimiento en el que se producen cambios plásticos. Para ello, se compararon grupos de ratas expuestos durante 25 días a un ambiente enriquecido con grupos expuestos durante 105 días. Se vio que no había diferencias en el grosor medio de la corteza en animales expuestos durante 80 y 30 días al enriquecimiento, además sólo se detectaron cambios en la corteza somatosensorial a los 30 días pero no a los 80 (Bennett et al., 1964; Diamond et al., 1964). De estos experimentos se dedujo que para que se produzcan cambios plásticos es importante que el entorno enriquecido presente novedad a los animales, ya que el establecimiento de una rutina hace que el entorno deje de ser enriquecido y que los cambios producidos en los primeros días disminuyan (Diamond, 2001). Sin embargo, se observó que cuanto más tiempo estaban los animales en este tipo de entorno más tiempo duraban los cambios de grosor en la corteza una vez que los animales volvían a las condiciones estándar de estabulación (Bennett et al., 1974).

Actividad física

La interacción de los animales con los objetos que forman parte de este ambiente enriquecido como pueden ser ruedas, rampas, plataformas a distintas alturas entre otras implica un aumento del ejercicio físico voluntario.

Ratas con una lesión en la corteza frontal izquierda que les había causado una disfunción motora en la pata delantera derecha sometidas a 30 días de enriquecimiento ambiental recuperaron significativamente el funcionamiento de la pata lesionada comparado con animales con la misma lesión mantenidos en condiciones estándar (McKenzie et al., 1990).

Estrés

El estrés es un factor que puede alterar los resultados de la exposición a un ambiente enriquecido, por lo que es importante controlar sus posibles causas. Éstas pueden deberse a la manipulación por parte del experimentador, la presencia de demasiados animales en la misma jaula, el cambio de juguetes frecuente, ruidos fuertes, olores de otros animales, e interrupciones en el ciclo de luz-oscuridad entre otros.

Los estudios realizados para tratar de identificar estos factores mostraron que la presencia de muchos animales en la jaula de enriquecimiento no produce estrés ya que la exposición de 36 ratas a 30 días de enriquecimiento comparada con la de 12 ratas el mismo periodo de tiempo produjo los mismos efectos, un aumento en el grosor de la corteza occipital medial comparado con ratas que habían vivido en condiciones estándar (Diamond et al., 1987).

El cambio de todos los juguetes de forma demasiado frecuente se ha demostrado causante de estrés. Se vio que si se cambiaban los juguetes varias veces al día los efectos de aumento de grosor cortical no se producían (Diamond, 2001). Por lo tanto es importante llegar a un equilibrio en el que el cambio de juguetes sirva para mantener la novedad en el ambiente pero de forma que no se estrese a los animales.

Los demás factores se pueden controlar teniendo a los animales en unas condiciones estandarizadas en cuanto al ciclo de luz-oscuridad, teniendo controladas las posibles fuentes de ruido, la presencia de otros animales y el amansamiento previo al comienzo del experimento.

El sistema trigeminal de la rata

El sistema trigeminal en roedores es un sistema especializado en el procesamiento sensorial. Los roedores están activos durante la noche y poseen una visión pobre, por lo que su supervivencia depende del sentido del tacto. El sentido del tacto en los roedores está mediado por la vibrissas, unos bigotes especializados que estos animales tienen en el morro; el tacto a través de estos bigotes (junto con el olfato) representa el principal medio por el que los roedores obtienen información del ambiente que les rodea. Los roedores usan sus vibrissas para localizar la posición del suelo, las paredes y los objetos, especialmente en ambientes oscuros así como para discriminar las características de tamaño y textura de los objetos (Diamond y Arabzadeh, 2013).

Como se ha comentado anteriormente, las vibrissas son pelos especializados debido a la presencia de mecanorreceptores en sus folículos, que son capaces de enviar una información somatosensorial extremadamente precisa. Estas vibrissas pueden moverse en virtud de la presencia de unos músculos especializados, su movimiento es rápido y rítmico y

se conoce como “*whisking*”. Para obtener información concerniente a la localización y a la textura de objetos las vibrisas se mueven hacia atrás y hacia delante de forma rítmica a unos 4-10 Hz (Carvell y Simons, 1990; Fanselow y Nicolelis, 1999; Kleinfeld et al., 1999). Cada bigote dentro de la misma columna (**Fig. 1**) explora una trayectoria diferente, mientras que los bigotes de una misma fila escanean la misma trayectoria (Brecht et al., 1997). La localización vertical de un objeto se deduce a través de lo que se denomina codificación espacial, basada en el perfil espacial de activación de cada bigote, es decir, de la activación de los distintos bigotes de una columna. La distancia desde la cara, o distancia radial, también se codifica en función a la activación de cada bigote, y se debe a que dentro de una misma fila hay un gradiente de longitud en los bigotes (Brecht et al., 1997). La localización horizontal se puede codificar por la diferencia temporal de activación de los bigotes (Ahissar y Arieli, 2001). Por lo tanto, para establecer la localización de un objeto en tres dimensiones toda esta información tiene que ser integrada, y parece ser que esto sucede gracias a un esquema ortogonal del que son responsables los aferentes primarios. Cada uno de los aferentes primarios es capaz de localizar un objeto por código espacial en el plano vertical, por código temporal en el plano horizontal y por código de intensidad en el plano radial lo que asegura una gran precisión y fiabilidad (Ahissar y Knutsen, 2008).

La almohadilla de vibrisas

Las vibrisas son para los roedores un órgano sensitivo tan importante como son las manos para los humanos y otros primates. En los roedores la almohadilla de vibrisas está formada por 5 filas de bigotes nombradas con letras de la A, más dorsal a la E, más caudal. En las dos filas superiores A y B hay cuatro folículos, mientras que en las filas C, D y E el número puede variar desde 7 a 12 bigotes (**Fig. 1**). Además hay otros cuatro bigotes largos (“*straddlers*”) localizados en el borde caudal de la almohadilla nombrados con letras griegas α - δ (Van Der Loos, 1976).

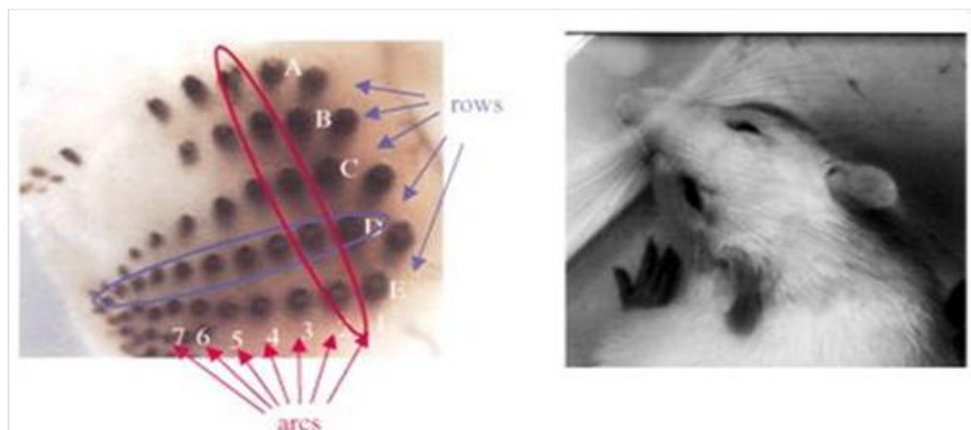


Figura 1: Organización de la almohadilla de vibrisas en una rata. En la imagen de la izquierda se puede observar la organización en filas (morado), nombradas con letras, y en columnas (magenta), numeradas con números arábigos. En la imagen de la derecha tenemos una visión desde arriba de la cabeza y los bigotes de una rata. Modificado de Ahissar y Arieli, 2001.

Las vibrisas también se conocen como macrovibrisas o vibrisas mistaciales, y cada una de ellas está identificada por una combinación única entre un número y una letra correspondiente a la fila y a la columna a la que pertenecen (Bosman et al., 2011; Diamond y Arabzadeh, 2013). Las vibrisas se mueven gracias a músculos extrínsecos e intrínsecos. Los músculos intrínsecos conectan pares de vibrisas y están situados dentro de la almohadilla. Los músculos extrínsecos tienen su origen fuera de la almohadilla, algunos se localizan justo debajo de la piel y otros justo debajo de los músculos intrínsecos. Todos están inervados por ramas del nervio facial (Dörfl, 1985).

El complejo seno-folículo (CSF)

Las vibrisas están localizadas en folículos pilosos especializados que tienen un seno sanguíneo, cambios de presión en este seno permiten variar la sensibilidad de los mecanorreceptores presentes en el complejo (Bosman et al., 2011; Fox, 2008). El CSF está formado por un folículo alargado de origen epidérmico revestido de un seno vascular de origen dérmico (**Fig. 2**). El folículo está compuesto por una serie de membranas concéntricas rodeadas por una gruesa membrana basal, la membrana vítrea. En la parte más superficial, la epidermis se engrosa originando una cresta que forma una especie de collar alrededor del pelo (*rete ridge collar*). El seno está revestido por una densa cápsula de colágeno que se expande según se dirige a la superficie para formar el cuerpo cónico externo, en el que se aloja una glándula sebácea. En la base del CSF, se encuentra la papila dérmica vascularizada y aquí la cápsula de colágeno se une al folículo. La membrana vítrea está recubierta por una envuelta mesenquimatosa que se expande en el cuello del folículo para formar el cuerpo cónico interno. El seno tiene dos partes diferenciadas, el seno

cavernoso, localizado en la mitad inferior, y el seno anular, en la mitad superior. El seno cavernoso está parcialmente ocupado por trabéculas, en cuyos espacios hay sangre y fibras nerviosas, mientras que el seno anular está abierto y en él se encuentra suspendido un apéndice en forma de anillo (*ringwulst*) que permite modular la presión dentro del seno (Bosman et al., 2011; Fox, 2002; Rice et al., 1997).

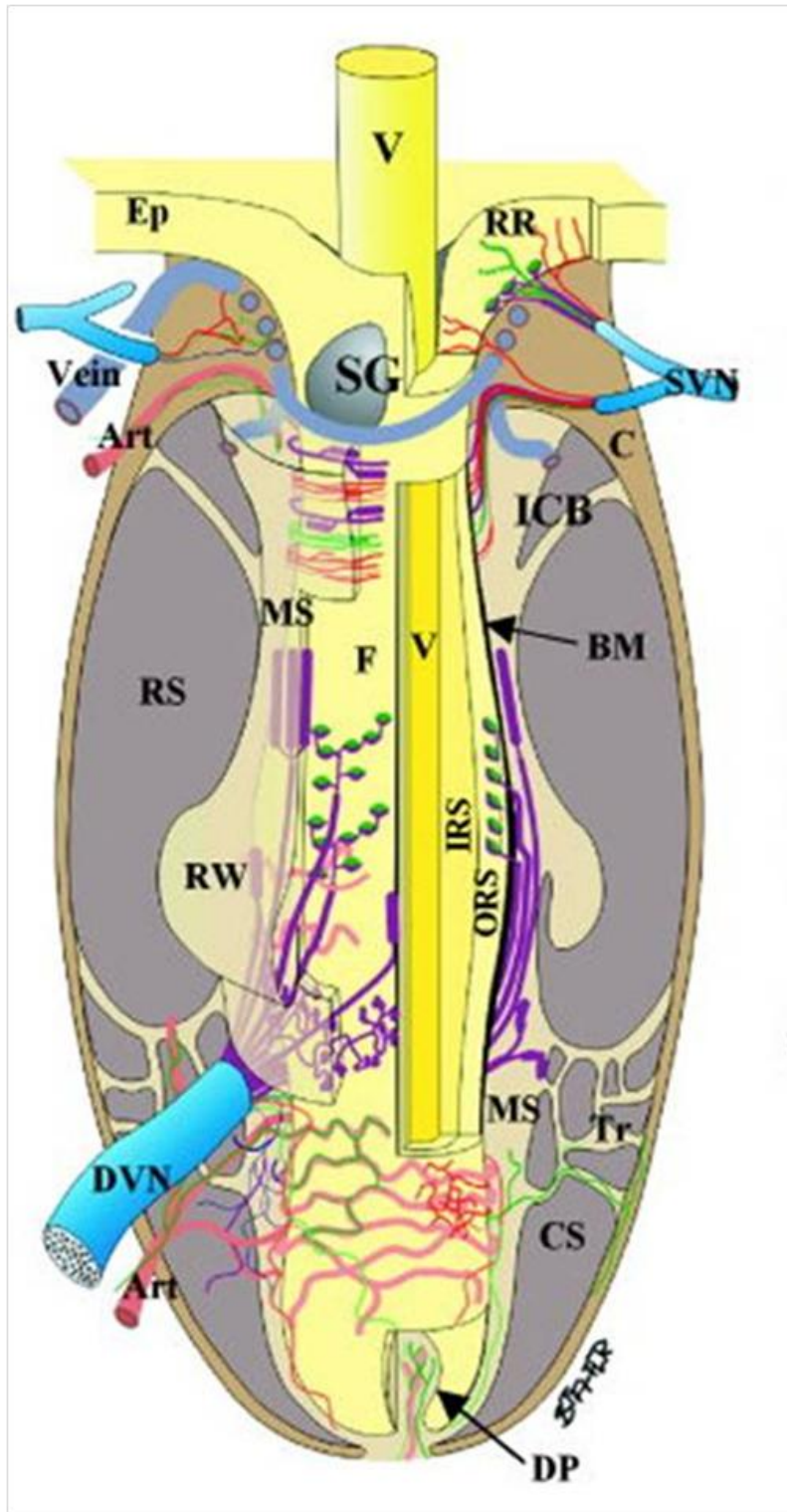


Figura 2: Dibujo de un corte longitudinal del complejo seno-folículo. La inervación del CSF está indicada en distintos colores dependiendo del tipo de fibra: en morado las fibras mecanorreceptoras mielinizadas, en verde las fibras amielínicas que se marcan con anticuerpos anti-CGRP, en rojo las fibras amielínicas no peptidérgicas y en azul oscuro la inervación simpática. Tomado de Park et al., 2003. V: vibrissa; Ep: epidermis; RR: rete ridge collar; SVN: superficial vibrissal nerve; SG: sebaceous gland; Art: arteriole; C: capsule; ICB: inner conical body; BM: basement membrane; MS: mesenchymal sheath; RS: ring sinus; F: follicle, RW: ringwulst; IRS: inner root sheath; ORS: outer root sheath; Tr: trabeculae; DVN: deep vibrissal nerve; CS: cavernous sinus; DP: dermal papilla.

Los receptores del sistema trigeminal se encuentran localizados en la piel de la cara, la mucosa nasal y oral, y en estructuras más profundas como el tejido subcutáneo, los músculos faciales y los tendones. Además de estos, la cabeza contiene numerosas estructuras especializadas que reciben inervación del trigémino, como la lengua y los dientes, la conjuntiva de la córnea y las vibrisas. Nosotros nos centraremos en la descripción de los mecanorreceptores de las vibrisas ya que es la estructura que más nos interesa, pero de forma general, los receptores que podemos encontrar formando parte de este sistema son los mismos que encontramos en el resto del cuerpo.

Las vibrisas están rodeadas por diferentes tipos de mecanorreceptores, células de Merkel, terminales lanceolados, corpúsculos de Pacini, terminales de Ruffini, terminales reticulares y terminaciones nerviosas libres (Andres, 1966; Renehan y Munger, 1986; Rice et al., 1997; Waite y Tracey, 1995) (**Fig. 2**). Los folículos están ricamente inervados por varios nervios pequeños superficiales (SVN, *superficial vibrissal nerves*), un nervio profundo (DVN, *deep vibrissal nerve*) y un pequeño número de fibras amielínicas que se localizan en la base del CSF (Rice et al., 1997; Waite y Jacquin, 1991). Cada folículo recibe aproximadamente 250 fibras nerviosas, de las cuales un tercio son amielínicas y predominantemente sensitivas, mientras que el resto son postganglionares simpáticas (Waite y Li, 1993). Tanto el SVN como el DVN contienen mayoritariamente fibras A β y A δ , el primero se encarga de inervar los mecanorreceptores que se localizan en la parte superior del CFS y el segundo los que se localizan en la parte baja. Las fibras más gruesas y mielínicas (A β) inervan a las células de Merkel y a los terminales lanceolados. Las células de Merkel son mecanorreceptores de adaptación lenta y van a detectar movimientos continuos, tienen una gran sensibilidad a la dirección del movimiento, presentando una posición de deflexión “preferida” (Jacquin et al., 1986a). Se localizan en la epidermis en dos zonas del CFS, a nivel del collar, donde parece que transmiten cuando hay una deflexión hacia atrás del pelo, y en el seno anular. Los terminales lanceolados son de adaptación rápida, se cree que detectan predominantemente movimientos inesperados y no parecen presentar sensibilidad a la dirección del movimiento (Jacquin et al., 1986a). Estos terminales presentan dos orientaciones distintas en el CSF, los que se encuentran a nivel del cuerpo cónico interno están orientados circunferencialmente, mientras que los que se localizan en el seno anular están orientados longitudinalmente y esto parece indicar que están implicados en la transmisión de distinto tipo de información mecánica, aunque no se sabe con certeza. Las fibras poco mielinizadas (A δ) inervan un grupo muy heterogéneo de terminales que se encuentran dispersos a lo largo de la envuelta epidérmica del CSF, aunque se concentran más en la zona del seno cavernoso. En la base del CSF, se encuentran fibras amielínicas (tipo C), que podrían transmitir impulsos dolorosos como por ejemplo tirones de las vibrisas (Andres, 1966; Ebara et al., 2002; Renehan y Munger, 1986; Rice et al., 1997). Por último, existe una pequeña proporción de fibras que requieren una elevada velocidad en los movimientos o que

tienen un umbral muy elevado de activación y se cree que podrían corresponderse con las terminaciones nerviosas libres (Jacquin et al., 1986a). Todas estas fibras sensitivas se unen con otras provenientes de otras zonas de la cara para formar la rama infraorbitaria (IoN) del nervio trigémino.

Dependiendo de su localización, los receptores están inervados por una de las tres ramas del nervio trigémino (V), la oftálmica, la maxilar o la mandibular. En la rata, la rama oftálmica (V1) inerva el dorso de la cabeza y las vibrisas supraorbitarias, la córnea y la conjuntiva, la piel pilosa y glabra del dorso y la punta de la nariz y la mucosa intranasal. La rama maxilar (V2) inerva la piel postorbitaria, el labio superior, las vibrisas mistaciales, la zona lateral de la nariz y la mucosa intraoral de la mandíbula superior y los dientes superiores. La rama mandibular (V3) inerva la articulación temporomandibular, la piel de la mandíbula y del labio inferior, la mucosa intraoral de la mandíbula inferior, los dientes inferiores y la lengua en su porción anterior. La duramadre y los vasos sanguíneos craneales también están inervados por las tres ramas. El nervio trigémino es un nervio mixto, por lo que tiene además una raíz motora que inerva los músculos masticadores y tiene su origen en el núcleo motor del trigémino.

La zona de vibrisas está inervada por el nervio IoN que pertenece a la rama maxilar del nervio trigémino. Este nervio contiene aproximadamente 33.000 fibras nerviosas separadas en unos 18-35 fascículos formados por axones mielínicos y amielínicos (Jacquin et al., 1984).

El ganglio trigémino

Los cuerpos neuronales de la mayoría de las fibras aferentes primarias se encuentran en el ganglio trigémino (TG), ganglio semilunar o de Gasser que se localiza en el medio de la fosa craneal en la base del cráneo (**Fig. 3**), a excepción de algunas aferencias de los músculos masticadores y receptores periodontales que tienen sus somas en el núcleo mesencefálico del trigémino. La mayor parte de la información sensitiva de las vibrisas que llega a las neuronas del ganglio trigémino lo hace a través del DVN, en lugar del SVN, aunque parece ser que el tipo de información que contiene estos dos tipos de nervios es muy similar (Waite y Jacquin, 1992).

En la rata, el ganglio del trigémino contiene un número variable de neuronas, que en una estimación conservadora osciló en torno a 35.000 en un estudio previo (Lagares y Avendaño, 2000). Las neuronas del TG, comparten muchas características morfológicas con las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, son pseudomonopolares y ambas pueden ser divididas en dos grandes subtipos: A y B. Esta subdivisión está basada en el tamaño de su soma y en distintos patrones de agrupación de los gránulos de Nissl aunque se pueden seguir dividiendo ulteriormente atendiendo a criterios de expresión de péptidos, enzimas o neurotransmisores (Kai-Kai, 1989). Las neuronas de tipo A, en general, son células con un

soma grande que contienen agrupaciones de gránulos de Nissl de tamaño mediano o pequeño, que suelen localizarse de forma preferente en las porciones centrales del citoplasma, representan más de la mitad de las células del ganglio y tiene prolongaciones entre gruesas y medianas mielinizadas (Lagares y Avendaño, 2000). Se caracterizan por la presencia de numerosos haces de neurofilamento, son positivas para RT97, un anticuerpo que reconoce las proteínas del neurofilamento de 68, 145 y 200 KDa (Kai-Kai, 1989). Las neuronas de tipo B, tienen un soma de pequeño a medio tamaño y contiene grandes acúmulos de cuerpos de Nissl distribuidos de forma variable por todo el citoplasma. En algunos casos estas agrupaciones tienden a concentrarse en la periferia del pericarion o a formar un anillo alrededor del núcleo. Representan menos de la mitad del total de células y tienen pequeñas prolongaciones finamente mielinizadas o amielínicas (Lagares y Avendaño, 2000). Se describen como no positivas para RT97, pero sí expresan arginina vasopresina (AVP), y otras sustancias como la somatostatina, oxitocina, y la sustancia P (Kai-Kai, 1989). Esta clasificación, no obstante, está sometida en la actualidad a revisión, teniendo en cuenta más datos derivados de la ultraestructura y la inmunocitoquímica (Avendaño et al., en desarrollo).

El ganglio trigémino además de contener los somas neuronales de los aferentes primarios también contiene dos tipos de células gliales, células de Schwann de tipo mielinizante y no mielinizante y células de la glía satélite (SGCs, *satellite glial cells*). Tanto las células de Schwann como las SGCs contienen glutamina, glutamina sintetasa, glutamato deshidrogenasa y piruvato carboxilasa (Miller et al., 2002). Estas enzimas tienen un papel fundamental no sólo en el mantenimiento del metabolismo neuronal si no también en la neurotransmisión glutamatérgica.

Las células de la glía satélite rodean completamente los somas de las neuronas sensoriales, formando una envuelta abundantemente plegada que se pega a la membrana plasmática de las neuronas dejando un espacio de tan sólo 20 nm. Las neuronas mandan numerosos procesos, algunos de los cuales forman invaginaciones en las células gliales, el papel de estas estructuras se desconoce, pero aumentan la superficie neuronal de manera considerable, y esto puede favorecer el intercambio de sustancias químicas entre los dos tipos de células (Hanani, 2005). Se cree que las SGCs participan en el procesamiento de la información sensitiva ya que la estimulación nerviosa o mecánica, produce aumentos en sus niveles de calcio citoplásmico y estos aumentos se extienden a otras SGCs e incluso a neuronas vecinas (Castillo et al., 2013). Además, el aumento de calcio se ha relacionado con la liberación de glutamato por parte de las SGCs (Wagner et al., 2014). De acuerdo con su posible papel en el procesamiento también se ha identificado la presencia de varios tipos de receptores de glutamato tanto ionotrópicos como metabotrópicos (Boye Larsen et al., 2014; Carlton y Hargett, 2007; Castillo et al., 2013; Tachibana et al., 1994).

El papel del glutamato como el principal neurotransmisor dentro del sistema nervioso periférico también se ha estudiado en las neuronas del TG y se ha demostrado que todos sus tipos de neuronas son capaces de liberar glutamato, incluso desde su soma (Kung et al., 2013). Además, estas neuronas expresan moléculas relacionadas con la transmisión glutamatérgica como receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Bouvier et al., 2015; Cahusac y Mavulati, 2009; Carlton y Hargett, 2007; Lu et al., 2002; Lu et al., 2003; Ma y Hargreaves, 2000; Marvizón et al., 2002; Miller et al., 2011; Sato et al., 1993; Willcockson y Valtschanoff, 2009), y otras relacionadas con la síntesis, transporte y liberación de glutamato (Brumovsky, 2013).

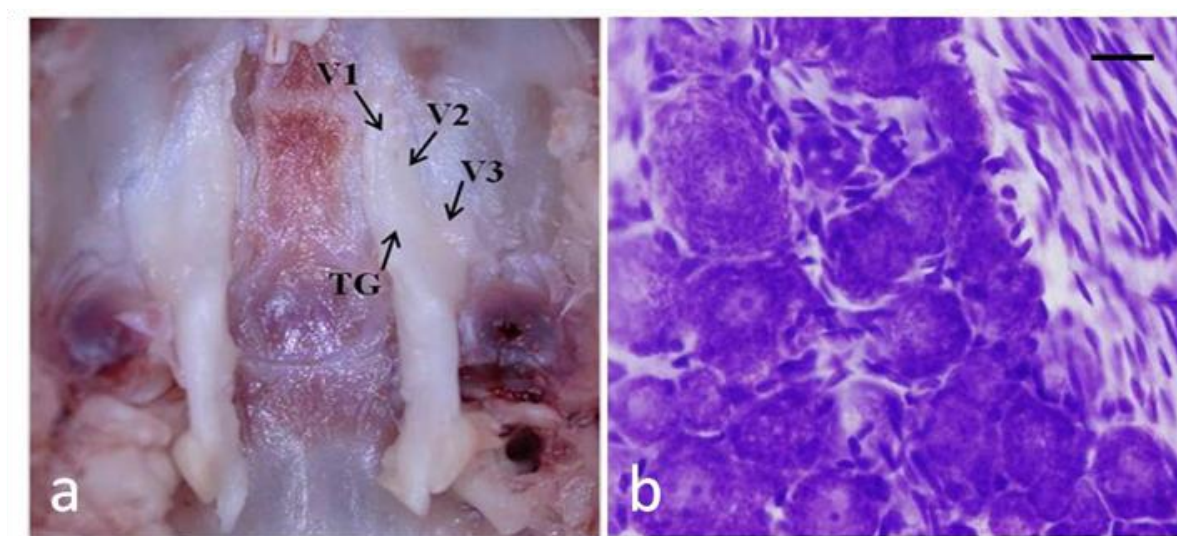


Figura 3: (a) Fotografía de la base del cráneo donde se pueden observar los dos ganglios trigéminos (TG). En el ganglio de la derecha se han indicado las distintas ramas del nervio trigémino: V1, rama oftálmica, V2, rama maxilar, y V3, rama mandibular. (b) Células del TG y fibras (extremo derecho) con una tinción de Nissl. *Barra de calibración:* 200 μ m.

Las neuronas dentro del ganglio trigémino están relativamente organizadas somatotópicamente, aunque las tres ramas no se pueden separar claramente. Las ramas oftálmica y maxilar son difícilmente distinguibles, mientras que la rama mandibular ocupa una posición más lateral (**Fig. 3**). Existe una organización dorsoventral, en la que las regiones caudales de la cara proyectan dorsalmente en el ganglio y las regiones rostrales proyectan ventralmente. Esta somatotopía es aproximada y hay regiones en las que se entremezclan somas de regiones adyacentes (Gregg y Dixon, 1973).

La información sensorial desde la periferia y a través del ganglio llega al tronco del encéfalo ipsilateral por la raíz del trigémino donde hará sinapsis con neuronas secundarias que se localizan en el complejo sensitivo trigeminal.

Sistema trigeminal: visión de conjunto

Los núcleos sensitivos del trigémino constituyen la entrada principal de la información proveniente de las vibrisas en el encéfalo. Se extienden desde el mesencéfalo hasta la parte alta de la médula espinal cervical y se dividen en tres grupos principales: el núcleo mesencefálico (Me5), el núcleo principal (Pr5), y el núcleo espinal (Sp5). A su vez, el Sp5 se divide en tres partes: oral (Sp5o), interpolar (Sp5ip), y caudal (Sp5c). En este trabajo nos centraremos en el estudio de los núcleos que reciben de forma principal aferentes primarios, el Pr5 y el Sp5. El complejo trigeminal también contiene el núcleo motor del trigémino (Mo5) que se localiza medial al Pr5, el núcleo supratrigeminal (Su5), en el borde dorsomedial del Pr5, el núcleo intertrigeminal, que se localiza entre Pr5 y Mo5, y el núcleo paratrigeminal, que se encuentra en la superficie medular lateral parcialmente embebido dentro del tracto espinal del trigémino. Los núcleos Mo5, Su5, y el intertrigeminal están asociados con los reflejos de masticación y el control del movimiento de la mandíbula. La función del núcleo paratrigeminal no se conoce con exactitud, recibe aferentes primarios desde la córnea y estructuras intraorales y podría jugar un papel en los reflejos nociceptivos viscerales (Waite y Tracey, 1995).

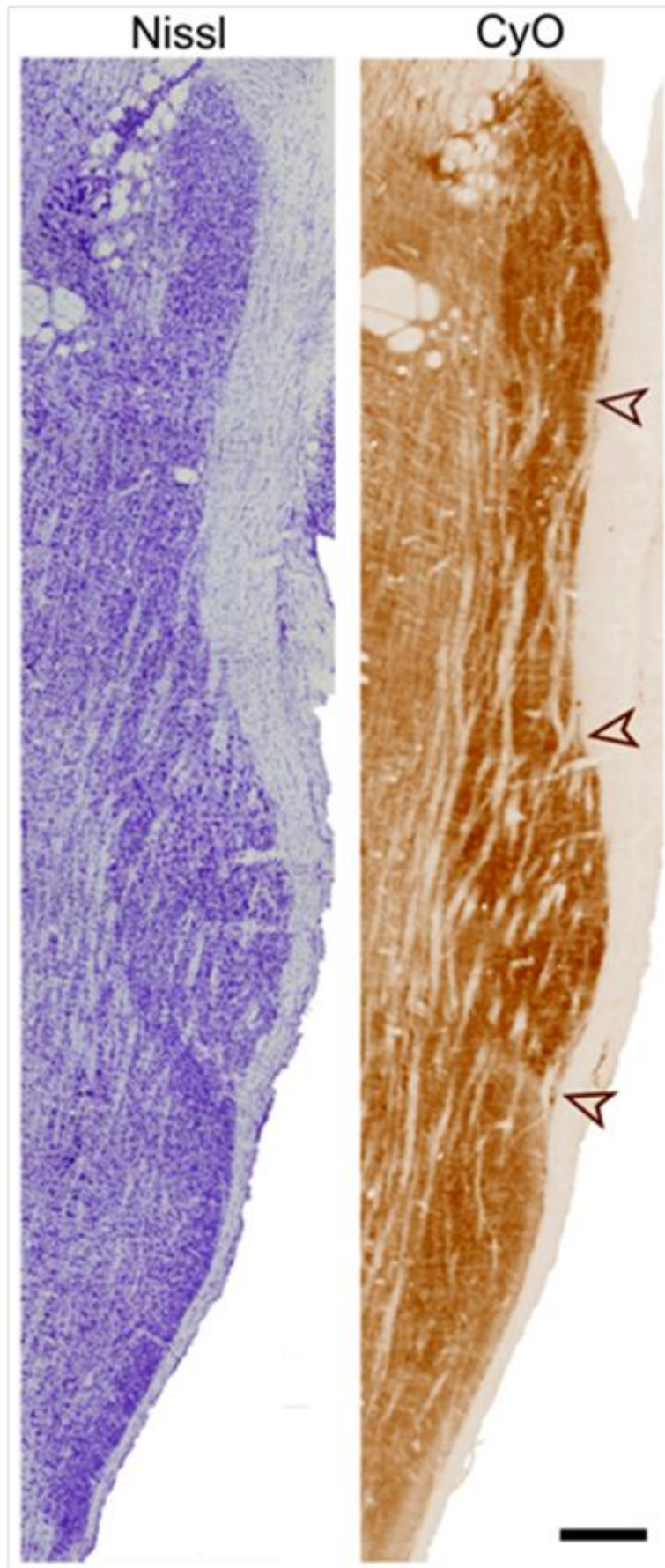


Figura 4: Secciones horizontales del tronco del encéfalo en las que se pueden observar los núcleos del complejo sensitivo trigeminal del tronco del encéfalo teñidas con Nissl (imagen de la izquierda) y con citocromo oxidasas (CyO, imagen de la derecha). Las flechas indican los límites entre los distintos núcleos, de rostral a caudal: el núcleo principal, el subnúcleo oral, el subnúcleo interpolar y el subnúcleo caudal. *Barra de calibración: 500 μ m.*

La raíz sensitiva del nervio trigémino entra en el tronco del encéfalo a nivel del puente lateral, adyacente a la raíz motora. Aquí se bifurca para dar lugar a una rama ascendente hacia Pr5 y otra descendente hacia Sp5 (Ramón y Cajal, 1904). Ambas ramas dan lugar a una serie de colaterales dirigidas medialmente que sinaptan en los núcleos trigeminales adyacentes (Hayashi, 1985) (**Fig. 5**). Existe una representación de las vibrisas en Pr5, organizada topológicamente en unos agregados histológicos denominados *barriletes*, que pueden visualizarse con diversas tinciones, como la citocromo oxidasa. Ni en Sp5o ni en Sp5c se detectan estos agregados, aunque también recibe terminaciones de las vibrisas. Los módulos del Sp5ip son similares. En secciones horizontales oblicuas, las terminaciones de cada vibrisa se ven como largas columnas rostrocaudales en todos los núcleos. En el Pr5, estos agregados se relacionan con las vibrisas principales y se encuentran en la parte ventral del núcleo, cada uno responde sólo a una vibrisa principal y tienen una organización somatotópica invertida, las vibrisas dorsales tienen una representación ventral y las rostrales una representación medial (Erzurumlu et al., 2010; Ma, 1991).

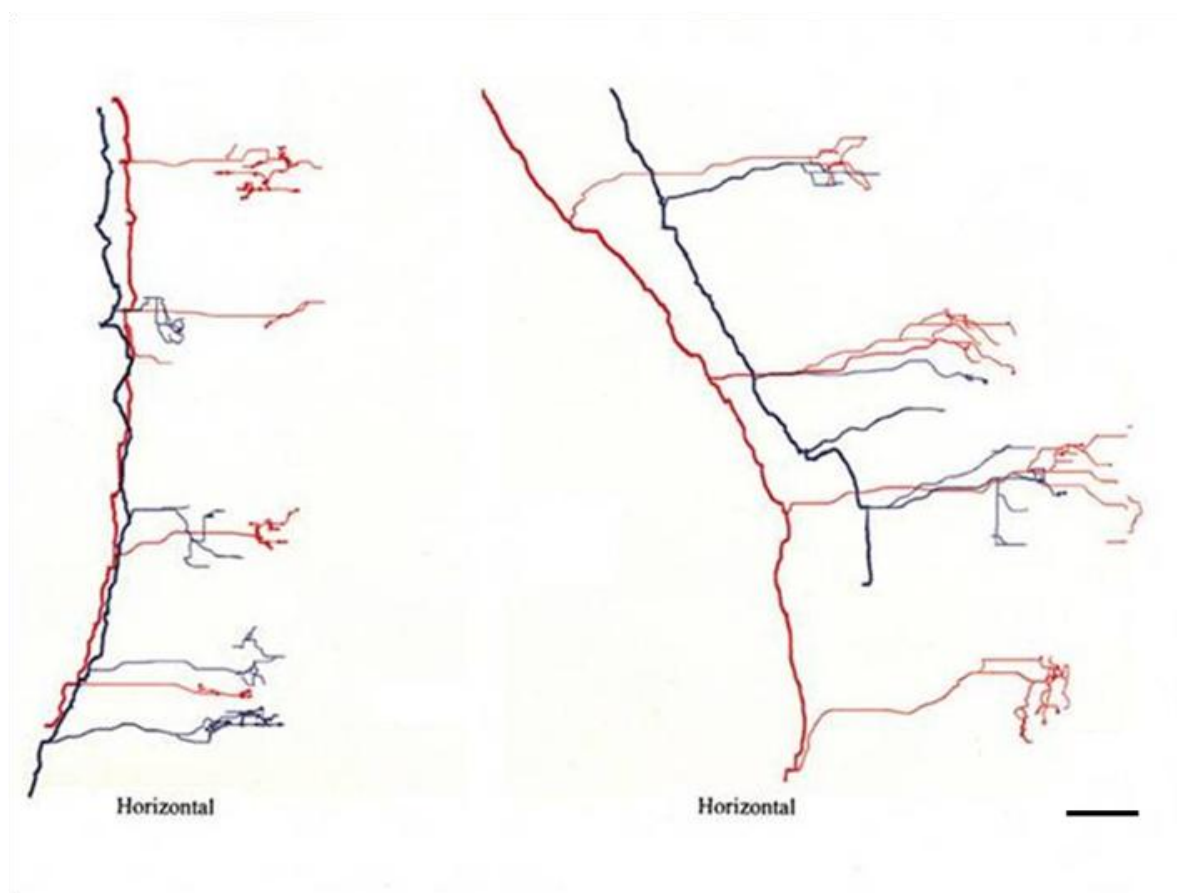


Figura 5: Ejemplos de terminaciones de aferentes primarios procedentes de las vibrisas en el núcleo principal, reconstruidos en su totalidad en el plano horizontal. Modificado de Jacquin et al., 2014. Barra de calibración: 100 μ m.

La información sensorial de las vibrisas llega a las neuronas de segundo orden del complejo trigeminal del tronco y desde aquí se decusa para proyectar al tálamo contralateral, en particular desde el Pr5 al núcleo ventral posteromedial (VPM) y desde el Sp5ip a la porción medial del núcleo posterior (Po) (Erzurumlu y Killackey, 1980; Smith, 1973).

El VPM tiene una forma de media luna en secciones coronales y contiene una población homogénea de neuronas multipolares de tamaño medio, que son las células de relevo tálamocortical, en las ratas no hay células GABAérgicas a diferencia de lo que sucede en carnívoros y primates (Barbaresi et al., 1986). La información está organizada somatotópicamente, con las zonas rostrales de la cara en la parte medial y las zonas caudales en la lateral (Van Der Loos, 1976). Como en el tronco del encéfalo, la información de cada vibrisa acaba en zonas discretas, que se han denominado *barriloides*, unos cilindros curvos orientados de forma oblicua; estos son más prominentes en la zona dorsomedial de VPM y van disminuyendo en la zona ventrolateral (Van Der Loos, 1976). En los *barriloides* pueden distinguirse tres compartimentos “*head*”, “*core*” y “*tail*”, que se corresponden con la zona más rostral, central y ventral del *barriloide* respectivamente y reciben aferencias de Pr5, los dos primeros, y de Sp5ip el último (Pierret et al., 2000; Urbain y Deschênes, 2007; Veinante et al., 2000). Los *barriloides* reciben mucha información desde Pr5, las neuronas *barrilete* proyectan a la zona “*core*” de los *barriloides* mientras que las neuronas *interbarrilete* proyectan a las zonas “*head*” de los mismos (Pouchelon et al., 2012). Sp5ip proyecta mayoritariamente a las zonas no *barriloides* del tálamo, que incluye el área alrededor de los *barriloides* (septos *interbarriloides*), y al Po (Williams et al., 1994). La mayoría de las células en el VPM tiene un campo receptivo pequeño que responde al movimiento de una o muy pocas vibrisas (Chiaia et al., 1991).

Las células del Po son multipolares y tienen una morfología variable y unos árboles dendríticos más extensos que los de VPM. Los aferentes trigeminales del Po llegan desde Pr5 y Sp5ip pero terminan de forma más difusa que los de VPM. Menos de la mitad de las células del Po se activan por el movimiento de las vibrisas; muchas células responden a estímulos eferentes de la cara, mucosa, o músculos y unas pocas son nociceptivas. En general, las células del Po tienen campos receptivos más grandes y responden con latencias más largas que las de VPM (Chiaia et al., 1991; Diamond et al., 1992).

Las vías de proyección que llegan a VPM transmiten información desde las vibrisas con latencias cortas, mientras que las que llegan a Po tienen latencias más largas. VPM recibe información tanto univibrisa desde el Pr5 como multivibrisa desde el Sp5, mientras que el Po sólo recibe información multivibrisa (Bosman et al., 2011). Se han identificado al menos cuatro vías ascendentes que transmiten información desde las vibrisas a la corteza somatosensorial contralateral (**Fig. 6**).

La *vía lemniscal* lleva la información de un único bigote desde los *barriletes* de Pr5 hasta la zona “*core*” de los *barriloides* de VPM y por último a los *barriles* de la corteza

somatosensorial primaria (S1). Aunque su principal diana son los barriles de la capa IV también tiene terminaciones en las capas V/VI de S1 (Veinante y Deschênes, 1999; Williams et al., 1994). Ésta vía parece estar relacionada con la discriminación de texturas, ya que permite que la respuesta a la deflexión de un bigote tenga una resolución temporal muy elevada (Pouchelon et al., 2012).

La *vía extralemniscal* lleva información multivibrisa desde las células *interbarrilete* de la parte caudal del Sp5ip a la zona ventrolateral de VPM y por último a los septos de S1 y a las capas IV y VI de la corteza somatosensorial secundaria (S2) (Pierret et al., 2000; Veinante y Deschênes, 1999).

La *vía paralemniscal* lleva información desde las neuronas multibrivisa localizadas en la parte rostral de Sp5ip al Po contralateral y termina en las capas Va y I de la corteza S1 así como a S2 y a la corteza motora primaria (Bosman et al., 2011; Pierret et al., 2000; Veinante y Deschênes, 1999; Williams et al., 1994;). Esta vía se relaciona con el control sensitivo-motor de los bigotes ya que no presenta una organización somatotópica fina y además las neuronas del Po no parecen responder a la deflexión de los bigotes (Pouchelon et al., 2012).

La *vía “dorsal”* que lleva información desde las células *interbarrilete* de Pr5 hasta Po y a células multivibrisa en las zonas “*head*” de los *barriloides* de VPM y termina en las zonas septales de S1 y en la capa VI (Urbain y Deschênes, 2007). Esta vía parece estar implicada en la modulación sensitivo-motora de la información lemniscal ya que las zonas “*head*” reciben conexiones desde la corteza motora (Pouchelon et al., 2012).

Las vías de procesamiento de la información no están totalmente aisladas en el tronco. Pr5 recibe numerosas conexiones desde Sp5 (Jacquin et al., 1990a), que por lo tanto conectan la información ascendente de la vía lemniscal y paralemniscal (Ma, 1991; Timofeeva et al., 2004).

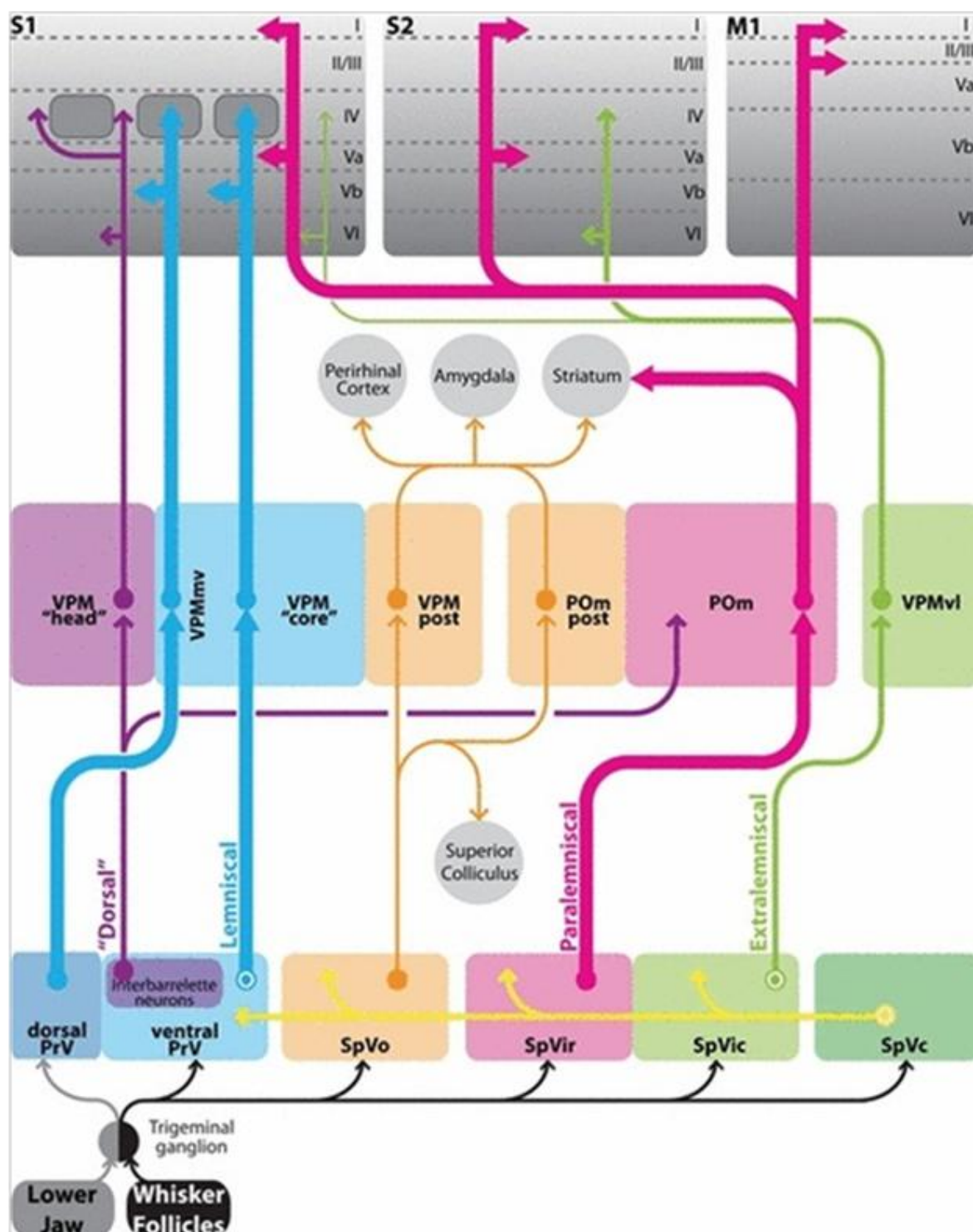


Figura 6: Resumen de la vías somatosensoriales de proyección desde los núcleos trigeminales al tálamo, y desde el tálamo a la corteza. Tomado de Pouchelon et al., 2012.

Las proyecciones desde VPM y Po terminan, entre otros lugares, en el área de barriles de la corteza somatosensorial primaria. Este área se denominó así por la presencia de unas agrupaciones de neuronas que daban la impresión de pequeños barriles, cada uno de

ellos consistiendo en un centro con pocas células, rico en aferentes talámicos, y unas paredes con alta densidad de células; la separación entre ellos se debe a unos septos con fibras intracorticales. Los barriles se localizan en la capa IV, se extienden ligeramente hacia la capa III y están organizados con un patrón similar a la disposición de las vibrisas del morro. A través de estudios electrofisiológicos se demostró que cada barril respondía principalmente a una vibrisa (Woolsey y Van der Loos, 1970). La información desde las vibrisas llega al campo de barriles en tan sólo 8 ms a través del VPM, por eso se considera esta, la vía primaria de información somatosensorial. Las células del Po, sin embargo, forman parte de una vía secundaria, la llegada de información es más lenta, 15-20 ms, y se produce a las zonas septales entre barriles (Diamond, 1995).

Desde la corteza de barriles la información llega a otras zonas de la corteza así como a otras zonas subcorticales. S1 mantiene conexiones homotípicas con S1 contralateral y otras recíprocas tanto ipsi- como contralaterales con la corteza motora primaria (M1), corteza somatosensorial secundaria (S2) y corteza perirrinal. Las conexiones ipsilaterales parten de las capas III y IV y se extienden a las capas II, IV y V de la corteza de barriles adyacente. Las conexiones contralaterales viajan a través del cuerpo calloso desde la corteza de barriles de un lado hacia la corteza de barriles, SII y la corteza perirrinal del otro lado (Diamond, 1995). La zona de barriles envía también proyecciones desde la capa VI a VPM, Po y al núcleo reticular del tálamo y desde la capa V los axones de las neuronas corticofugales dejan una colateral en Po cuando se dirigen hacia sus dianas subcorticales como el colículo superior y todos los núcleos del tronco del encéfalo (Deschênes et al., 1998; Killackey et al., 1989).

Complejo Nuclear Sensorial Trigeminal

El complejo nuclear sensorial del trigémino se sitúa justo medial a la raíz y al tracto del trigémino, ocupa una posición lateral en el puente y se va haciendo más dorsolateral según se acerca a los niveles caudales del bulbo, uniéndose gradualmente con el asta dorsal de la médula espinal en los primeros niveles cervicales. Se trata de un complejo continuo, limitado medialmente de forma poco precisa por varios elementos de la formación reticular y lateralmente de forma clara por el tracto descendente del trigémino. Los bordes rostrales y caudales de cada núcleo dentro del complejo también son difíciles de identificar ya que se orientan de forma oblicua. Se divide fundamentalmente en cuatro núcleos rostrocaudales: principal, oral, interpolar y caudal (**Fig. 4**) (Avendaño et al., 2005; Ma, 1991).

El sistema trigeminal se desarrolla de forma centrípeta desde etapas tempranas del desarrollo. El complejo trigeminal del tronco y el patrón relacionado con las vibrisas se desarrollan en los días del nacimiento (E21), cuando ya ha tenido lugar la neurogénesis (E13-14). En esos días sólo se encuentran agrupaciones relacionadas con las vibrisas en las zonas más laterales de los núcleos trigeminales, esto también sucede con la almohadilla de

vibrisas, en las que las vibrisas caudales se desarrollan primero. A lo largo de los siguientes días se van desarrollando las zonas más mediales siguiendo el mismo patrón que las vibrisas faciales (Erzurumlu y Killackey, 1983). Si se cauteriza una fila de vibrisas el día del nacimiento, se produce una degeneración de los aferentes primarios y como consecuencia las neuronas trigémino-talámicas no se agrupan siguiendo un patrón normal. Sin embargo, si esta misma lesión se produce en los días postnatales 2-3 los patrones de agrupación en el tálamo y la corteza no se ven afectados, ya que las neuronas de los núcleos del trigémino ya se han agrupado. La actividad mediada por receptores NMDA también se ha demostrado esencial para el desarrollo de estos patrones de agrupación específicos de las vibrisas, para el crecimiento normal de los terminales axónicos y para la ramificación de las dendritas en Pr5. La eliminación de la subunidad NR1 o la reducción de su expresión, impide el desarrollo de estos patrones en Pr5, además afecta también al desarrollo de sus terminales axónicos y a la morfología de las dendritas de las células *barrilete* (Lee, 2005). Por lo tanto la formación de un patrón normal en las estructuras más rostrales de la vía depende de la correcta formación de los *barriletes* en el Pr5. Lesiones en este núcleo impiden la formación de los *barriloides* en el VPM del tálamo pero si estas lesiones se realizan en el Sp5 no se producen alteraciones en el resto de la vía (Killackey et al., 1990).

En la rata adulta el complejo sensorial trigeminal ocupa un volumen de 8,72-10,20 mm³, del cual el 14,8% lo ocupa el Pr5, el 17% el Sp5o, el 28,2% el Sp5ip y el 40% el Sp5c. El número total de neuronas de este complejo es de 239.400-332.000, de las cuales el 11,7% está en el Pr5, el 7,7% en el Sp5o, el 22,5% en el Sp5ip y el 58,1% en el Sp5c. Existe una diferencia del número medio de neuronas entre lados, teniendo más neuronas el complejo nuclear izquierdo. La densidad neuronal cambia entre los distintos núcleos: Sp5o es el núcleo con menor densidad y Sp5c el que tiene mayor densidad, mientras que la densidad de Sp5ip y Pr5 es similar (Avendaño et al., 2005).

En los núcleos del trigémino se pueden encontrar tres tipos de neuronas según su patrón de proyección: neuronas de proyección que envían parte o la totalidad de sus ramas axónicas fuera del complejo trigeminal; neuronas internucleares que envían sus ramas axónicas a núcleos dentro del complejo distintos al que contiene su soma; y neuronas intrínsecas que distribuyen sus ramas axónicas mayoritariamente dentro del núcleo que contiene su soma (Avendaño et al., 2005).

Núcleo Principal del trigémino

El Pr5 es el núcleo situado más rostral dentro del complejo trigeminal, se encuentra en el puente lateral y en un corte coronal, tiene una forma alargada con dos suaves dilataciones dorsal y ventral. Rostralmente comienza al mismo nivel que Mo5 y se extiende caudalmente a nivel del polo rostral del núcleo facial, donde se continúa con Sp5o. Su unión

con Sp5o es oblicua y se distingue por el límite que marcan los grupos celulares del Pr5 que están más condensados.

Las ramas del trigémino llegan de forma ordenada a este núcleo, la rama mandibular inerva su porción dorsal, mientras que su porción ventral está inervada por las ramas oftálmica y maxilar. En la parte ventral del Pr5 se localizan los *barriletes*, la representación anatómica de las vibrisas (Bates y Killackey, 1985). Forman una especie de tubo cilíndrico con un borde densamente poblado de células y una parte central que casi no tiene células. Están separados entre ellos por unos septos y se distinguen mal en cortes coronales, ya que no son perpendiculares a su eje mayor. Los aferentes primarios terminan formando unas ramificaciones densas de forma cilíndrica orientadas somatotópicamente en la parte ventral de Pr5 reflejando el patrón de los *barriletes* (Jacquin et al., 1993).

Existen tres tipos neuronales en este núcleo: neuronas *barrilete*, neuronas *interbarrilete* y neuronas GABAérgicas (Ginestal y Matute, 1993; Ma, 1991). Las neuronas *barrilete* tienen sus árboles dendríticos dentro de un solo *barrilete*, mientras que las *interbarrilete* extienden sus dendritas a varios *barriletes*. Las neuronas GABAérgicas son de tamaño pequeño y participan en circuitos locales. Las células *barrilete* e *interbarrilete* pueden diferenciarse también por sus propiedades electrofisiológicas, las *barrilete* responden a una sola vibrisa y reciben una fuerte inhibición lateral (Lo et al., 1999) de las vibrisas vecinas y las *interbarrilete* reciben entradas excitatorias de muchas vibrisas y una inhibición lateral débil (Erzurumlu y Kind, 2001).

Existen dos tipos de proyecciones trigémino-talámicas, las de tipo 1 que se dirigen a un único *barriloide* en el VPM contralateral y las de tipo 2, que proyectan tanto al Po como a otras regiones mesencefálicas y diencefálicas. Las primeras son mayoritarias y forman una agrupación de ramificaciones en un sólo *barriloide*, mientras que las de tipo 2 son más dispersas y representan sólo el 23% del total (Chiaia et al., 1991). Además de estas proyecciones, el Pr5 proyecta de forma escasa al cerebelo (Mantle-St John y Tracey, 1987), al colículo superior (Killackey y Erzurumlu, 1981), la zona incerta (Nicoletis et al., 1992), y al núcleo pretectal anterior (Yoshida et al., 1992). El campo de *barriletes* recibe una amplia proyección descendente desde la corteza, estas fibras llegan a las zonas *interbarrilete* y proceden sobre todo de la corteza contralateral (Jacquin et al., 1990b). El Pr5 y sus conexiones están relacionados con la información del tacto epicrítico y protopático.

Subnúcleo Oral del trigémino

El subnúcleo oral se localiza en la porción más rostral del Sp5 y está a continuación de la porción más caudal del Pr5. Ocupa el mismo espacio rostrocaudal que el núcleo del facial. Los bordes medial y ventromedial están marcados por la abundancia de fascículos de fibras mielínicas que en parte pertenecen a la formación reticular parvocelular pontina, y en parte conectan al núcleo con las fibras perifaciales del núcleo facial. Su borde dorsomedial

es difícil de identificar, debido a que su citoarquitectura es muy cambiante en su mitad dorsal, la relativa escasez de fascículos y el patrón más intrincado de la formación reticular.

Sus células tienen árboles dendríticos extensos y espinosos a los que llegan bastantes colaterales internucleares y tienen una funcionalidad equivalente a la de las células de Sp5ip (Jacquin et al., 1986a). Tiene proyecciones con el tálamo, el cerebelo, la médula espinal y otras estructuras del tronco (Jacquin y Rhoades, 1990). Este núcleo junto con sus proyecciones podría estar relacionado con las reacciones emocionales al tacto (Deschênes y Urbain, 2009).

Subnúcleo interpolar del trigémino

El Sp5ip se extiende desde el nivel caudal del núcleo facial hasta por debajo del óbex. Se encuentra entre Sp5o y Sp5c al que se une de forma oblicua. En la parte ventral del núcleo, donde se encuentra la zona de respuesta a las vibrisas se pueden distinguir dos divisiones citoarquitectónicas. La división magnocelular que ocupa la mitad rostral y la división parvocelular que ocupa la mitad caudal de Sp5ip.

Los campos receptivos de sus células también son extensos como en Sp5o (Jacquin et al., 1989a; Jacquin et al., 1989b). Además existen dos tipos celulares funcionalmente distintos, células de respuesta multivibrisa, que proyectan al tálamo y al cerebelo, y células de respuesta monovibrisa, que forman parte de circuitos locales y proyectan a otras divisiones del complejo trigeminal (Jacquin et al., 1986b; Jacquin et al., 1989a; Jacquin et al., 1989b; Jacquin et al., 1990a).

Los axones de Sp5ip proyectan al VPM contralateral en su porción ventrolateral, donde los *barriloides* están menos definidos. Los núcleos Pr5 y Sp5ip tienen una proyección complementaria en el VPM. Las terminaciones que viene de una sola vibrisa terminan de forma específica en un único *barriloide*, las terminaciones que viene de Pr5 contacta con más frecuencia con los somas de las células de VPM, mientras que las que vienen de Sp5ip contactan con las dendritas distales (Pierret et al., 2000; Veinante et al., 2000; Williams et al., 1994).

Las principales proyecciones de Sp5ip son al cerebelo, tanto de forma directa como indirecta a través de los núcleos de la oliva y al colículo superior. También tiene proyecciones a Po, la zona incerta, y al núcleo pretectal anterior (Waite y Tracey, 1995). El Sp5ip contiene células de respuesta multivibrisa que proyectan al tálamo o al cerebelo, y de respuesta monovibrisa, que forman parte de circuitos locales que proyectan a otras divisiones del complejo trigeminal (Jacquin et al., 1986b; Jacquin et al., 1989a; Jacquin et al., 1989b; Jacquin et al., 1990a).

Subnúcleo caudal del trigémino

El Sp5c se extiende en el bulbo desde el nivel del óbex hasta la médula cervical superior, con la que se continúa. Empieza rostralmente con una zona de transición flanqueada lateralmente por la parte caudal de Sp5ip, tiene una estructura laminada en su zona caudal y se estrecha hasta unirse con el asta dorsal cervical superior (Avendaño et al., 2005). Su disposición laminar es parecida a la del asta dorsal de la médula espinal, con una lámina marginal (lámina I), sustancia gelatinosa (lámina II) y capa magnocelular (lámina III y IV) (Olszewski, 1950). Algunos autores distinguen también una lámina V.

La lámina I contiene distintos tipos celulares, con algunas células grandes multipolares alineadas de forma paralela al tracto espinal. La lámina II contiene en su mayoría células pequeñas de forma oval o fusiforme. La capa magnocelular contiene células multipolares de tamaño medio. Las neuronas de la lámina I proyectan a varias regiones del tálamo, que incluyen el VPM, el núcleo gelatinoso (Yoshida et al., 1991), y los núcleos intralaminares y Po (Peschanski, 1984). Las neuronas de las láminas I y II también proyectan al núcleo del tracto solitario (Menétrey et al., 1992) y a la zona incerta. La capa magnocelular proyecta al núcleo facial (Erzurumlu y Killackey, 1979). El Sp5c posee también proyecciones internucleares con todos los demás núcleos del trigémino que son importantes en la modulación de las propiedades de las respuestas del resto de los núcleos (Hallas y Jacquin, 1990).

El núcleo se puede dividir en dos partes principales de acuerdo con su función. Las láminas I y II están implicadas en la transmisión nociceptiva, son la principal zona de terminación de los aferentes primarios amielínicos (fibras C) y finamente mielinizados ($A\delta$) y proyectan directamente a niveles cerebrales superiores involucrados en el procesamiento del dolor y la temperatura (Crissman et al., 1996). Las láminas III y IV están implicadas en el procesamiento de las funciones sensitivo-motoras y reciben la entrada de fibras grandes mielínicas ($A\beta$). Esta zona, donde se encuentran representadas las vibrisas, proyecta a la división lateral del núcleo facial, que inerva los músculos de la almohadilla de vibrisas, por lo que podría estar controlando los movimientos reflejos de las vibrisas (Erzurumlu y Killackey, 1979).

Sistema glutamatérgico y plasticidad

El glutamato es el neurotransmisor más común presente tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico por lo que parece lógico pensar que este sistema de neurotransmisión tendrá un papel importante en los cambios plásticos del cerebro.

Su implicación en la plasticidad es evidente desde las etapas de desarrollo, donde juega un papel crucial para la maduración de las sinapsis glutamatérgicas. Durante este periodo los receptores AMPA que contiene subunidades permeables al Ca^{2+} son incorporados a lo que se conoce como sinapsis silentes, en las que sólo hay receptores NMDA. En las etapas tempranas del desarrollo, la subunidad GLUR4 es crítica para la potenciación en el hipocampo, donde es reclutada en respuesta a actividad sináptica débil (Zhu et al., 2000). Más tarde, estos receptores AMPA son reemplazados por receptores que contienen subunidades GLUR2, que son impermeables al Ca^{2+} . Este tráfico de receptores es fundamental para que se produzca este tipo de plasticidad sináptica durante el desarrollo y si este se bloquea se impide la plasticidad (Cline y Haas, 2008; Haas et al., 2006; Hickmott y Ethell, 2006; Zhu et al., 2000). De hecho, el bloqueo de la inserción de receptores AMPA (GLUR1 y GLUR2) en las sinapsis de las neuronas del techo óptico de *Xenopus* produce un crecimiento dendrítico y una maduración de la sinapsis aberrante. Además, los receptores AMPA son esenciales para el crecimiento de los árboles dendríticos dependiente de la experiencia ya que cuando se bloquea la incorporación de GLUR1 y GLUR2 a las sinapsis la plasticidad estructural por estimulación visual en renacuajos no se produce (Haas et al., 2006). Las dendritas en la neocorteza adulta cambian en respuesta a modificaciones en la experiencia (enriquecimiento ambiental, aprendizaje sensitivo-motor, privación, exposición a drogas, etc.) o a patrones de actividad a través de la activación de neurotransmisores. Los receptores NMDA pueden tener efectos sobre la estructura de las dendritas aumentando la concentración intracelular de Ca^{2+} lo que produce la activación de cascadas de señalización (por ejemplo la de CREB) que median cambios morfológicos (Hickmott y Ethell, 2006).

De hecho, se ha demostrado que la activación de los receptores de glutamato puede influenciar la protracción y la retracción de las espinas dendríticas. Por ejemplo, la activación del receptor de NMDA durante protocolos de LTP produce la formación de nuevas espinas en rodajas de hipocampo (Engert y Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999). Además, parece ser que la estabilización de las espinas requiere la activación de los receptores AMPA, que son capaces de prevenir la retracción, parando la dinámica de la actina a través de la despolarización de la célula (Fischer et al., 2000). Los receptores de glutamato se relacionan con el remodelado de la actina a través de unas GTPasas llamadas Rho-GTPasas. Se ha encontrado que la subunidad GLUR1 del receptor AMPA y la subunidad NR2A del receptor NMDA se encuentran asociados con la proteína RhoA, perteneciente a esta familia, cuando estos receptores se encuentran activados. Además se ha visto en el hipocampo, que cuando se produce una despolarización de la célula, esta asociación se reduce y se produce una retracción activa de las espinas. Parece ser que la disociación de RhoA de los receptores reduce su actividad y su capacidad de cambiar al citoesqueleto de la espina (Schubert et al., 2006).

Los mecanismos responsables de la maduración y del crecimiento de las sinapsis y las dendritas son muy similares a los que se producen en la plasticidad dependiente de la experiencia. Hay un gran número de ejemplos sobre cambios moleculares, estructurales y funcionales derivados de la eliminación de la información de entrada y la mayoría implican cambios en la transmisión glutamatérgica. Por ejemplo, la vibrisectomía parcial induce una regulación a la baja del mRNA de la GAD en la representación cortical de las vibrisas que han sido eliminadas y la sobreexpresión de la subunidad GLUR2 en las que han sido conservadas. Parece ser que estos cambios transitorios están destinados a restablecer el balance entre los sistemas excitatorios e inhibitorios modificados en respuesta a la disminución de la entrada sensorial (Gierdalski et al., 1999).

Los receptores AMPA que contienen la subunidad GLUR1 se han relacionado con los fenómenos de potenciación que ocurren tras estimulación de la entrada sensorial. Estos receptores normalmente se incorporan a las sinapsis entre las capas IV y II/III cuando se produce LTP en respuesta a la experiencia sensorial. Se ha visto que el recorte de bigotes, que interrumpe la entrada de esta información, es capaz de evitar la incorporación de estos receptores y esto impide la plasticidad (Takahashi, 2003). Además, si se elimina la subunidad GLUR1 del receptor AMPA se reduce la LTP por bloqueo de su componente postsináptico (Hardingham y Fox, 2006).

Los receptores AMPA también están implicados en fenómenos de depresión dependiente de la experiencia en la corteza de barriles (capas II/III y IV), ya que los ratones en los que se ha eliminado la subunidad GLUR1 no presentan este tipo de plasticidad (Wright et al., 2008). Cambios en los receptores de glutamato también se han observado en la corteza visual tras privación monocular. Por ejemplo, la activación del receptor NMDA es necesaria para que se den cambios plásticos en la corteza visual tras privación monocular en ratones adultos (Sawtell et al., 2003). También se encontró que la subunidad GLUR2 del receptor AMPA estaba regulada de forma diferencial en la corteza visual tras privación monocular (Tropea et al., 2006) y, que la privación monocular, producía un descenso en la fosforilación de la subunidad GLUR1 que también se ha observado en la corteza de barriles (Hardingham y Fox, 2006).

La reorganización plástica de los mapas representacionales en la corteza cuando se arrancan los bigotes implica fenómenos de depresión inducidos por LTD dependientes de receptores NMDA en las sinapsis desde capa IV a capas II/III (Allen et al., 2003). Además, los fenómenos de potenciación que se producen tras depresión también podrían estar mediados por receptores AMPA que tienen la subunidad GLUR1. Parece ser que la depresión produce desfosforilación de la subunidad GLUR1 y que su posterior fosforilación por acción de la PKA, aumentaría el tiempo de apertura del canal AMPA y esto podría explicar la LTP que se produce tras LTD inducida por privación (Banke et al., 2000).

La desfosforilación de la subunidad GLUR1 también puede jugar un papel en la plasticidad durante la depresión de las respuestas. En la corteza visual, la privación monocular disminuye la fosforilación de GLUR1 en el sitio específico para PKA (Heynen et al., 2003). En la corteza de barriles, se ha visto que la eliminación de la subunidad GLUR1 impide la depresión de las respuestas sinápticas que normalmente acompaña a la privación de los bigotes. Por lo que la depresión dependiente de experiencia requiere la subunidad GLUR1. La potenciación no se ve tan afectada por la falta de esta subunidad, probablemente por la existencia de mecanismos alternativos como la potenciación inducida por óxido nítrico (Hardingham y Fox, 2006).

Estos cambios no sólo se dan en la corteza, en otras regiones del sistema nervioso central, cambios en la transmisión glutamatérgica son responsables de fenómenos de plasticidad sináptica. En el cerebelo, hay una forma de LTD, asociada con el aprendizaje motor, impulsada por la activación de receptores metabotrópicos mGLUR1 y mantenida por la incorporación de receptores GLUR2 a la sinapsis y que se bloquea como consecuencia de la delección genética de la familia de proteínas GRIP; proteínas de andamiaje implicadas en la estabilización de receptores AMPA que contienen las subunidades GLUR2/3 (Takamiya et al., 2008). Otro ejemplo de la implicación no sólo de los receptores de glutamato, sino también de estas proteínas de andamiaje relacionadas con la plasticidad sináptica viene de fenómenos de LTP y LTD en el hipocampo. PICK1 funciona como un sensor capaz de detectar cambios en los niveles de Ca^{2+} citosólico y en función de éstos regula el tráfico de receptores AMPA con subunidades GLUR2 dentro y fuera de las sinapsis. Durante los fenómenos de LTD es capaz de mediar la internalización de receptores con subunidades GLUR2 mientras que los aumentos de Ca^{2+} grandes y rápidos asociados con los fenómenos de LTP disparan la liberación de este tipo de receptores para mantener la potenciación (Terashima et al., 2008).

La exposición a un ambiente enriquecido induce plasticidad dependiente de la experiencia y esta parece estar mediada también, al menos en parte, por mecanismos relacionados con los receptores de glutamato. Se sabe que periodos largos de exposición a un ambiente enriquecido son capaces de regular la expresión de los receptores de glutamato en el prosencéfalo. Se han detectado aumentos en la subunidad GLUR1 de los receptores AMPA y de las subunidades NR1, NR2A y 2B de los receptores NMDA que además se asociaron con una mejora en la realización de varias tareas de memoria plástica (Tang et al., 2001). El aumento en la subunidad NR2A también se observó en el hipocampo de ratas que habían sido sometidas a un mes de enriquecimiento ambiental; este cambio estaba acompañado por un descenso del transportador ácido de aminoácidos excitatorios de tipo 1 (EACC1), lo cual podría estar relacionado con un incremento del glutamato en las sinapsis. En el mismo trabajo, sin embargo no se encontraron cambios en la subunidad GLUR1 de los receptores AMPA (Andin et al., 2007).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las alteraciones de las entradas sensoriales producen modificaciones duraderas en los mapas sensoriales de representación, en el procesamiento de señales y en la estructura de axones, dendritas y sinapsis. En este proceso dinámico participan un gran número de mecanismos moleculares, celulares y circuitales. El sistema trigeminal es uno de los sistemas que más se ha utilizado como modelo para el estudio de la plasticidad funcional y estructural dependiente de las entradas sensoriales, y aunque la investigación se ha centrado en las áreas sensoriales corticales, se sabe que la plasticidad no es una característica intrínseca de la corteza y que tanto áreas subcorticales como periféricas son capaces de experimentar cambios plásticos. Sin embargo, se ignora cuál es el comportamiento de los axones primarios y sus terminaciones en los núcleos trigeminales tras cambios sostenidos en la experiencia sensorial. Las neuronas primarias son las primeras que reciben la información y luego la transmiten al resto de los componentes de la vía, por lo que son fundamentales en el procesamiento somatosensorial y por ello pensamos que van a jugar un papel importante en la plasticidad. Con esta idea en mente, nos planteamos estudiar los efectos de la modificación de la entrada sensorial, por privación del tacto activo por recorte crónico unilateral de vibrisas o por exposición a un ambiente enriquecido, sobre los aferentes primarios del sistema trigeminal en ratas adultas jóvenes con el OBJETIVO GENERAL de examinar si los cambios duraderos en la experiencia sensorial son capaces de inducir modificaciones estructurales en las neuronas sensitivas primarias y si estos cambios morfológicos se acompañan de modificaciones moleculares en estas mismas estructuras. Para ello realizamos dos tipos de abordajes, el estudio morfológico de las terminaciones de los aferentes primarios que provienen de un único DVN en el tronco del encéfalo y el estudio molecular del TG, sede de la gran mayoría de los somas correspondientes a esas fibras aferentes.

Para ello organizamos el trabajo de Tesis en torno a los siguientes OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Estudiaremos el patrón de terminación de las fibras aferentes primarias que provienen de un único DVN en los núcleos sensitivos trigeminales en el tronco del encéfalo y cuantificaremos el número y el tamaño de las varicosidades presentes en esos axones.

Analizaremos y cuantificaremos los efectos producidos por una pérdida de entrada sensorial producida por eliminación del tacto háptico por recorte crónico unilateral de vibrisas en el patrón de terminación, en el número y tamaño de las varicosidades en esos mismos núcleos.

Analizaremos y cuantificaremos los cambios producidos en el patrón de terminación, en el número y tamaño de las varicosidades en esos mismos núcleos tras exposición repetida en el tiempo a un ambiente enriquecido.

Analizaremos el patrón de expresión de genes relacionados con la plasticidad sináptica en los TGs de animales controles para determinar la existencia de posibles asimetrías. En particular centraremos nuestra atención en el estudio de la expresión génica y proteica de receptores y proteínas relacionadas con la neurotransmisión glutamatérgica.

Analizaremos los cambios que se producen en el patrón de expresión de estos genes y proteínas en ambos TGs tras privación del tacto háptico por recorte crónico unilateral de vibrisas.

Analizaremos los cambios que se producen en el patrón de expresión de estos genes y proteínas en ambos TGs tras exposición repetida a un ambiente enriquecido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación y grupos

Todos los procedimientos realizados con animales en este estudio fueron aprobados con anterioridad por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid y cumplen con el Real Decreto 53/2013 y con la directiva de la Comunidad Europea 2010/63/UE. Los experimentos se realizaron en un total de 90 ratas macho Sprague-Dawley (Harlan Ibérica, Barcelona). Se emplearon animales procedentes de madres distintas para evitar posibles interferencias génicas en los resultados experimentales. A los 21 días de vida, los animales fueron destetados y trasladados a una habitación con temperatura controlada y con el ciclo luz/oscuridad (12h/12h) invertido. Los animales fueron alojados en condiciones estándar de estabulación, en cajas de 28x48x28 cm, y dispusieron de comida y agua *ad libitum* hasta el momento del sacrificio. Los procedimientos experimentales no comenzaron hasta que los animales fueron adultos jóvenes (≥ 60 días de edad), tiempo en el que se acostumbraron al ciclo circadiano y a la habitación.

Se establecieron 4 grupos experimentales. En resumen, este fue el protocolo común utilizado en cada uno de ellos, así como el número total de animales en cada grupo y el código del grupo:

Grupo control (C, n= 32): animales mantenidos en las condiciones estándar de estabulación desde los 21 días de vida hasta el final del experimento.

Grupo con recorte (*trimming*) de vibrisas (T, n= 30): animales a los que a partir de los 60 días de vida se les recortan las vibrisas del lado derecho 3 veces por semana durante 6 semanas. Los animales se estabulan en condiciones estándar durante todo el experimento.

Grupo “enriquecido” (E, n= 28): animales que, llegados a la edad adulta, estabulados en condiciones estándar, se ponen en una jaula de enriquecimiento (80x100x60 cm) en grupos de 8, 4 horas al día, 5 días a la semana, durante 6 semanas.

Manejo de los animales de experimentación

Amansamiento (“handling”)

Este procedimiento se realiza sólo con los animales del grupo T, ya que son los que requieren manipulación frecuente por parte del experimentador. Este protocolo tiene como objetivo acostumbrar al animal a la manipulación a la que va a ser sometido posteriormente

para poder así reducir el estrés derivado de su manejo. Una semana antes de que se inicie el recorte de vibrisas, los animales son inmovilizados, cogidos y mantenidos en manos del experimentador que posteriormente les realizará el recorte de las vibrisas. Los animales son elevados sujetándolos por detrás de las patas delanteras; una vez inmovilizados, se les realiza un movimiento circular que ayuda a mantenerlos relajados. Cuando el animal está quieto, con las patas traseras relajadas, muestra de que el animal está tranquilo y habituado a la manipulación, se les permite explorar las tijeras que más adelante se usarán para el recorte de bigotes.

Los animales del grupos C sólo son manipulados para la limpieza de sus jaulas y la alimentación; en el caso del grupo E, además, los animales se trasladan a la jaula de enriquecimiento y de vuelta a su caja de estabulación una vez al día cinco días a la semana. Este tipo de manipulación no supone un estrés potencial para los animales.

Recorte de vibrisas

El recorte de vibrisas (Grupo T) se inicia la semana que los animales cumplen 60-63 días de edad. Sólo se recortan en su totalidad las vibrisas del lado derecho del morro de los animales, el procedimiento se realiza tres veces por semana, en días alternos, durante el periodo de inactividad de los animales (condiciones diurnas) intentando realizarlo aproximadamente a la misma hora todos los días.

Para realizar el recorte se inmoviliza a los animales con la mano izquierda haciendo una leve presión sobre el suelo de la jaula, una vez que el animal está tranquilo se eleva lentamente sujetándolo por debajo de las patas delanteras. Se recortan todas las vibrisas del lado derecho utilizando las tijeras con extrema precaución para no lesionar al animal, no dejando en ningún caso bigotes de más de 1 mm de largo.



Figura 7: En la imagen de la izquierda se observan las vibrisas del morro de una rata. En la imagen derecha se observa el procedimiento de recorte de las vibrisas.

Ambiente enriquecido

El ambiente enriquecido (Grupo E) consiste en grupos de 8 animales que se colocan en una jaula de 80x100x60 cm con paredes transparentes de metacrilato, fondo de lecho de viruta y una tapa de rejilla metálica. En esta jaula previamente se colocan una serie de elementos “no naturales” como plataformas, rampas y juguetes con distintas texturas (tubos, bolas, cajas); y elementos “naturales” como piñas, piedras y palitos. Todos los días se colocan recompensas (cereales azucarados) en distintos lugares de la jaula para fomentar la exploración de los animales y una vez por semana se cambian la disposición de las rampas y plataformas y parte de los objetos. Los animales se mantienen en esta jaula 4 horas al día, 5 días a la semana durante su periodo de máxima actividad (condiciones nocturnas), por un total de 7 semanas consecutivas.



Figura 8: Jaula de enriquecimiento con los distintos objetos, que incluyen elementos no naturales como juguetes y plataformas y otros elementos naturales como piedras.

Cirugías y procedimientos invasivos

Inyección de trazadores en el nervio profundo de la vibrisa C1

Antes de comenzar la cirugía, se prepararon pipetas de vidrio con filamento de vidrio de 1,5 mm x 0,86 mm diámetros externo e interno (Glass capillary filament, AM Systems, Sequim, WA), estiradas en un estirador vertical de pipetas (Narishige). La punta de la pipeta se recortó cuidadosamente bajo el microscopio hasta obtener un diámetro interno de aproximadamente 20-30 μm . En el barril de estas pipetas se depositó con una microjeringa un tapón de silicona de unos 2-3 mm de longitud dejando un espacio vacío en la punta, que posteriormente se llenó con la mezcla de los trazadores mediante una jeringa

Hamilton. Esta mezcla consistió en una disolución de tampón fosfato salino (PB 0,01 M más 0,15 M NaCl) de la subunidad B de la toxina colérica (CTB, Sigma Aldrich) al 2%, Isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia* (IB4, Vector Laboratories) al 2% y trazas del colorante supravital Verde Luz (Sigma Aldrich). La solución se introdujo en una jeringa Hamilton de 10 µl, y ésta se acopló a la micropipeta de vidrio atravesando la silicona con la punta y rellenando ese espacio que se había dejado vacío con la mezcla de trazadores.

Los animales se anestesiaron por inyección intramuscular con una mezcla de Ketamina (55 mg/kg): Xilacina (15 mg/kg): Atropina (0,2 g/kg). Toda la cirugía se realizó usando una lupa quirúrgica (Zeiss-Jena). Después de identificar la vibrisa C1, se practicó una pequeña incisión justo detrás de la zona donde comienzan a aparecer las vibrisas. Se separó la piel con sumo cuidado utilizando unas tijeras microquirúrgicas hasta identificar y aislar parcialmente el folículo, y exponer el nervio profundo de la vibrisa (DVN). Ambos se separaron con mucho cuidado del tejido conectivo circundante y se apoyaron sobre una estrecha plataforma de metal asegurándose de no estirar el nervio (**Fig. 9**). Con ayuda de un micromanipulador, la micropipeta de vidrio acoplada a la jeringa Hamilton se introdujo con sumo cuidado en el nervio profundo de la vibrisa donde se inyectaron 1-1,5 µl de la solución antes mencionada en unos 3-4 pulsos separados, durante 30-40 minutos. El color verde de la solución permitió confirmar que esta iba penetrando en el nervio y no se vertía fuera de él. Finalmente se suturó la piel con una sutura de seda 4/0 (LorcaMarín), se limpió la herida con povidona iodada (Betadine, Meda Pharma, SAU) y se administró suero salino subcutáneo. Se dejó un tiempo de supervivencia de cuatro días para permitir un adecuado transporte axoplásmico transganglionar de los trazadores. En dos animales el tiempo de supervivencia se redujo a 24 horas, el tiempo adecuado para analizar el marcado en el DVN y en el ganglio del trigémino.

Control de peso de los animales

Durante la duración de los procedimientos experimentales se siguió un control de peso de los animales para confirmar que ninguno de los procedimientos afectaba al desarrollo normal de los animales. Se pesó a los animales en tres ocasiones: a los 21 días de edad, cuando se comenzó el procedimiento experimental (inyección del trazador, comienzo enriquecimiento o recorte de bigotes) o día equivalente en los animales control y el día de la perfusión. En cada período de medida, no se observaron cambios de peso entre los animales de los distintos grupos experimentales.

En todos los grupos se observaron características básicas indicadoras de bienestar animal como el aspecto de su pelaje, evolución del peso o signos de estrés. Además los animales del grupo E fueron observados diariamente al principio del periodo de enriquecimiento, en busca de signos de estrés (aislamiento o falta de exploración en la jaula)

y los animales del grupo T, se observaron en días alternos mientras duró la manipulación. Ningún animal mostró signos de estrés.

Sacrificio de los animales

Experimentos de trazado

Una vez transcurrido el tiempo de transporte de los trazadores, los animales se anestesiaron profundamente por inyección intraperitoneal de 0,2 ml/100 g de peso con una solución de pentobarbital sódico (Dolethal, Vétoquinol) a 0,33 mg/ml en suero salino (NaCl 0,9%). Se abrió la pared costal y el diafragma dejando el corazón expuesto y a continuación se insertó una cánula en la aorta ascendente a través del ventrículo izquierdo. A través de ella se realizó la perfusión con una bomba peristáltica de flujo regulable. Se inició pasando a velocidad alta 100-150 ml de suero salino (NaCl 0,9%) a temperatura ambiente, seguidos de 400-500 ml de paraformaldehído (Panreac) al 4% en tampón fosfato sódico (PB) 0,1 M a pH 7,4 y 6-10°C de temperatura. Se extrajo el cerebro y se obtuvo un bloque que contenía el tronco del encéfalo. Se extrajeron también los ganglios trigéminos de ambos lados, y, en alguna ocasión, se extrajo el nervio profundo de la vibrisa C1. El tejido se posfijó en el mismo fijador, a 4°C, en agitación, durante toda la noche y al día siguiente se crioprotegió en sacarosa al 30% en PB 0,1 M durante dos días.

Experimentos de Western blot y de análisis génico

Los animales utilizados para los experimentos de Western blot (WB) y de análisis génico se anestesiaron de la misma forma que en el caso de los animales perfundidos y fueron decapitados utilizando una guillotina. A continuación y de la forma más rápida posible se extrajo el cerebro y se microdisecaron la corteza de barriles, el núcleo principal del trigémino, el núcleo caudal y los ganglios trigéminos, en todos los casos de forma separada los lados izquierdo y derecho. La extracción se realizó sobre un soporte refrigerado con hielo y el tiempo máximo de extracción total nunca superó los 12 minutos desde la decapitación. Para el trabajo realizado en esta Tesis sólo se utilizaron los ganglios trigéminos. El tejido destinado al análisis mediante Western blot se congeló rápidamente a -80°C hasta su posterior utilización y el tejido destinado a la extracción de mRNA se conservó en un tampón frío específico para estabilizar el RNA a razón de 10 µl/mg de tejido (RNAlater®, Qiagen, CA, USA) que se congeló a -80°C.

Procesamiento del tejido

Microtomía y recogida del tejido

El tronco del encéfalo, tras la crioprotección, se pegó con Tissue-Tek (Sakura) a la platina de un micrótopo de congelación Leica SM2400 (Leica Biosystems, Nussloch, GmbH) por la parte ventral y se cortó de dorsal a ventral en el plano horizontal a 40 µm de grosor. Se recogieron todos los cortes en dos series alternas, una para el revelado de la CTB y otra para el revelado de IB4, en una placa multipocillo de 12 con PB 0,1 M. El tejido se marcó en el lado izquierdo con una aguja fina para saber su orientación.

Los ganglios trigéminos y el nervio profundo de la vibrisa, tras la crioprotección, se congelaron, y se cortaron en el plano horizontal y en el plano transversal respectivamente, en un criostato Leica CM1950 (Leica Biosystems, Nussloch, GmbH). El tejido se incluyó en un bloque de Tissue-Tek (Sakura) que se dejó congelar y se cortó en su totalidad a 15 µm de grosor, en el caso del ganglio, y a 8 µm, en el caso del nervio. Se recogieron dos series del TG y todo el DVN en portaobjetos gelatinizados para el revelado de CTB e IB4.

Extracción de RNA

Para la extracción del RNA se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante de la micromatriz (*microarray*). El RNA total se extrajo de un conjunto de cuatro ganglios por grupo experimental y por lado. El tejido se disgregó utilizando el sistema TissueLyser en presencia de un tampón tiocianato de guanidina altamente desnaturante que además inactiva las RNasas para evitar la degradación del RNA. El mRNA se extrajo de forma robotizada (*Qiacube robotic work station*) utilizando el RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Este sistema permite separar el RNA combinando la centrifugación a alta velocidad con su unión a una membrana de sílica. Una vez disgregado, el tejido se centrifugó, se conservó el sobrenadante y se le añadió etanol para fomentar la unión del RNA a la membrana de sílica. La mezcla se introdujo en una columna *RNeasy Mini spin* y se centrifugó, el RNA total quedó unido a la membrana mientras que los contaminantes quedaron en el sobrenadante que se descartó. A continuación se lavó la columna tres veces con distintas soluciones, como indica el fabricante, y por último el RNA se eluyó en H₂O libre de RNasas.

La pureza de RNA se determinó con el ratio A260/A280 y fue superior a 1,8 en todos los casos, la ratio de absorbancia fue calculada usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific Inc., GA, New York). La integridad de la banda ribosómica se analizó con un bioanalizador (*Agilent 2100 Bioanalyzer*, Agilent Technologies, USA, Santa Clara) y el número de integridad del RNA (*RNA Integrity Number*, RIN) fue superior a 7 en todos los casos.

Estos procedimientos se realizaron en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, con una inestimable ayuda de su personal.

Extracción de proteínas

Para el análisis proteico, cada uno de los ganglios se homogenizó por separado. La homogenización se realizó en hielo añadiendo 200 µl de tampón de lisis (20 mM Tris pH 7,5, 1% NP-40, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptina, 1 mM PMSF y un cóctel inhibidor de proteasas (COMPLETE™ Mini, Roche) usando con un sonicador (UP50H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany) hasta la completa disgregación del tejido. Se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C durante tres minutos y se recogieron los sobrenadantes. Se calculó la concentración de proteínas utilizando el kit comercial *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fischer Scientific Inc., GA, New York) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cargaron entre 30-60 µg de proteínas en cada pocillo. Los extractos se prepararon para su separación por electroforesis añadiendo tampón de ruptura (250 Mm Tris pH 6,8; 4% SDS, 10% glicerol, 2% β-mercaptoetanol y 0,0006% azul de bromofenol) y se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos.

Inmunohistoquímica

Revelado con diaminobencidina (DAB)

La inmunohistoquímica para CTB e IB4 en el tronco del encéfalo se realizó en flotación en placas multipocillo de 12 usándose una serie para revelar CTB y la serie alterna para el revelado de IB4. Se lavaron los cortes en PB 0,1 M para eliminar los posibles restos de sacarosa. El primer paso fue la inactivación de la peroxidasa endógena mediante un lavado de los cortes con una solución de H₂O₂ (Panreac) al 1% en PB 0,1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). A continuación, se hicieron tres lavados de 15 minutos con PB 0,1 M y otros tres de 15 minutos con PBS 0,02 M (PB 0,2 M, H₂O destilada, NaCl 0,9%) con Tritón X-100™ (Sigma Aldrich) al 2%. Tras los lavados, se transfirieron los cortes a la solución de bloqueo (PBS, suero de cabra o de conejo dependiendo del anticuerpo secundario 5%, BSA 2%, Tritón X-100™ 2%) durante 2 horas en agitación a TA. Después se pasó a la incubación con el correspondiente anticuerpo primario: la serie 1 se incubó con el anticuerpo conejo-α-CTB (1:500, Sigma Aldrich) y la serie 2 con el anticuerpo cabra-α-IB4 (1 µg/ml, Vector Laboratories) durante toda la noche a 4°C en agitación en la misma solución de bloqueo.

Al día siguiente las placas multipocillo se dejaron atemperar durante 1 hora aproximadamente a TA y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 0,02 M. Tras ello se

incubaron los cortes en el anticuerpo secundario: la serie 1 se incubó con el anticuerpo cabra- α -conejo (1:500, Sigma Aldrich) y la serie 2 con el anticuerpo conejo- α -cabra (1:250, Vector Laboratories), ambos biotinilados, durante 2 horas en agitación a TA en la misma solución de bloqueo. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron los cortes 4 veces durante 5 minutos con PBS 0,02 M y se incubaron con una solución de avidina-biotina (Kit ABC Elite[®], Vector laboratorios) preparada en PBS 0,02 M más Tritón X-100[™] al 2% durante 3 horas en agitación a TA. Posteriormente, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS 0,02 M y uno con PB 0,1 M, tras lo cual los cortes se incubaron 10 minutos en una solución con diaminobencidina (DAB, Sigma Aldrich) al 0,05% en PB 0,1 M con cloruro de cobalto al 0,008% y sulfamato de níquel(II) al 0,0064%. Se revelaron añadiendo H₂O₂ al 0,0051% a cada pocillo, durante un tiempo variable dependiendo del progreso de la reacción (habitualmente entre 5 y 15 min). El revelado finalizó con tres lavados con PB 0,1 M para detener la reacción y eliminar cualquier resto de DAB.

Por último, los cortes se pasaron a una solución de PB 0,03 M, desde la cual se montaron conservando el orden y la orientación y se dejaron secar al menos 24 horas. Una vez secos, se deshidrataron en alcoholes crecientes (70%, 80%, 95%, y 100%, dos veces este último, 10 minutos en cada uno) y se desengrasaron en xileno (Panreac) (60 minutos en seis pases) para finalizar se cubrieron las muestras con DePeX[®] (Serva). Las secciones se examinaron y se fotografiaron en un microscopio Olympus BX61.

Revelado fluorescente

El revelado fluorescente en los troncos del encéfalo se realizó en flotación, mientras que en los ganglios trigéminos y las secciones de nervio profundo de la vibrisa se realizó sobre el portaobjetos en una cámara húmeda. En ambos casos las soluciones y los anticuerpos usados fueron los mismos. Tras pasar por un lavado en PBS 0,02 M para eliminar posibles restos se incubaron las secciones en solución de bloqueo (PBS 0,02 M, suero de burro 10%, Tritón[™] X-100 1%) durante 2 horas a TA. A continuación, se incubaron durante toda la noche a TA en el caso de la incubación sobre portaobjetos y a 4 °C en agitación, en el caso de los troncos del encéfalo, con una mezcla de anticuerpos primarios: conejo- α -CTB (1:500, Sigma Aldrich) y cabra- α -IB4 (1 μ g/ml, Vector Laboratories), preparada en la misma solución de bloqueo. Al día siguiente, se realizaron 4 lavados durante 5 minutos con PBS 0,02 M y se pasó a la incubación con una mezcla de anticuerpos secundarios: burro- α -conejo AlexaFluor[®]647 y burro- α -cabra AlexaFluor[®]488 (1:200; Invitrogen[™]) durante 2 horas en oscuridad a TA. Después se lavaron 4 veces durante 5 minutos con PBS 0,02M, se montaron conservando el orden y la orientación y se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield[®], Vector Laboratories).

Antes del análisis de las preparaciones en el microscopio confocal, la localización y la calidad de la inmunofluorescencia se valoró con el equipo de epifluorescencia integrado

en un microscopio Olympus BX61, usando los filtros de excitación y las lentes apropiadas para ello.

Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron con un microscopio confocal TCS SP5 Spectral Leica utilizando para las imágenes a baja magnificación una lente 20X en seco, y un objetivo de inmersión en aceite de 63X y gran apertura numérica (1.4) para visualizar la colocación de los trazadores a nivel de axón único. De cada campo, las imágenes se obtuvieron secuencialmente a 1024×1024 píxeles. Para las imágenes a gran magnificación, se obtuvieron 12-24 secciones de $0.5 \mu\text{m}$ de separación en el eje z (espesor). El grado de colocación entre CTB e IB4 en las secciones se determinó con el programa LAS AF software, utilizando proyecciones ortogonales, las demás secciones también se analizaron con el mismo programa.

Microarray

Para la realización del análisis genético en el ganglio del trigémino se utilizó un microarray comercial, RT² ProfilerTM PCR Arrays (Qiagen, Valencia, CA, USA). Los datos de su desarrollo se pueden encontrar la página web:

http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PARN-126Z.html.

El microarray incluye 84 genes implicados en plasticidad sináptica entre los que se encontraban genes de expresión temprana (IEGs), genes de expresión tardía (LTGs), genes implicados en la potenciación (LTP) y en la depresión a largo plazo (LTD), moléculas de adhesión celular, de la matriz extracelular e implicadas en el procesamiento proteolítico, cofactores CREB, receptores neuronales y proteínas de la densidad postsináptica entre otros. Además de los 84 genes implicados en la plasticidad sináptica, el microarray incluía: 5 genes de expresión constitutiva (*housekeeping genes*), el control para DNA genómico, los controles de la retrotranscripción, y tres controles positivos para la PCR. La casa comercial garantiza alta reproducibilidad y una fuerte correlación (coeficiente de correlación medio de > 0.99) entre las distintas réplicas, lotes e instrumentos, lo cual asegura que las diferencias de expresión detectadas entre muestras biológicas fuesen fiables y de alta especificidad.

El RNA total (50 ng) se retrotranscribió usando el kit RT² First Strand (Qiagen, Valencia, CA, USA). Este kit contenía los oligonucleótidos ricos en timina, hexámeros al azar, la transcriptasa inversa y todos los tampones necesarios para llevar a cabo la reacción para obtener el cDNA que se usó posteriormente en el microarray. Se siguieron las instrucciones del fabricante para realizar el cóctel de retrotranscripción, la reacción se llevó a cabo a 42°C durante 15 minutos y se detuvo calentando las muestras a 95°C durante 5 minutos. El perfil de expresión de los genes se determinó utilizando el formato de 384 pocillos Synaptic Plasticity RT² ProfilerTM PCR Array (SaBiosciences, USA) usando la mezcla maestra RT² SYBR Green/ROX qPCR (Applied Biosystems, UK) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esta mezcla incluía el tampón para la PCR a tiempo real,

una polimerasa de alto rendimiento (HotStart DNA Taq polymerase), nucleótidos, y los colorantes ROX® o Fluoresceína. La PCR cuantitativa se realizó utilizando un termociclador ABI 7900HT qPCR instrument (Thermo Fischer Scientific Inc., GA, New York) equipado con el software SDS 2.3 con el siguiente protocolo: un primer ciclo a 95 °C, 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C, 15 segundos y un minuto a 60 °C. Al igual que la extracción del RNA, estos procedimientos se realizaron en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

Western blot

Los extractos proteicos se separaron en geles de acrilamida/bisacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) al 10% y 8%, dependiendo del tamaño de las proteínas que se querían detectar, en un sistema Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad) a 50 mA. A continuación se transfirieron a una membrana Inmobilon-P (Millipore Iberica SA, Madrid, Spain) mediante transferencia húmeda en frío a 70 mA, 2 horas. Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 2 horas a TA, en agitación, con BSA al 5% en TTBS (Tris 1 M pH 7,5, NaCl 5 M, Tween-20 0,0005%). A continuación, se incubaron en la misma solución de bloqueo diluida 10 veces toda la noche a 4°C en agitación con los anticuerpos primarios: conejo- α -Receptor ionotrópico de Glutamato 1 (subtipo AMPA) (1:1000, Abcam); conejo- α -Receptor ionotrópico de Glutamato 2 (subtipo AMPA) (5 μ g/ml, Abcam); conejo- α -Receptor ionotrópico de Glutamato 4 (subtipo AMPA) (1:1000, Cell Signaling Technology®); conejo- α -Receptor ionotrópico NMDA2B (1:200, Abcam); conejo- α -Receptor metabotrópico de Glutamato 3 (5 μ g/ml, Abcam); conejo- α -Receptor metabotrópico de Glutamato 8 (1:1000, ThermoFisher Scientific); y pollo- α - β 3-Tubulina (1 μ g/ml, Abcam). Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos en TTBS y las membranas se incubaron 1 hora a TA, en agitación, con los anticuerpos secundarios correspondientes: cabra- α -pollo (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y cabra- α -conejo (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Tras 3 lavados de 10 minutos en TTBS, las membranas se incubaron en el líquido de revelado Advance Western-blotting Detection Kit (GE Healthcare, Barcelona, Spain). Finalmente, la densidad óptica se cuantificó usando el programa Scion Image® Alpha 4.0.3.2.

Estereología

Identificación de varicosidades

Los perfiles marcados con CTB que se consideraron varicosidades fueron desde pequeñas dilataciones esferoidales localizadas en axones teñidos de forma tenue hasta

grandes protuberancias de forma ovoide o irregular. Hubo que tener en cuenta que las varicosidades presentes en axones de calibre muy fino iban a quedar por debajo de la resolución del microscopio óptico y por lo tanto su recuento iba a estar subestimado. Otros problemas de sesgo en el recuento de varicosidades pequeñas fueron: subestimación debido a la no detección de alguna varicosidad muy pequeña o a que quedaban “tapadas” por las varicosidades de gran tamaño, y/o sobreestimación al incluir en el recuento secciones transversales de axones finos que podían confundirse con varicosidades sin serlo.

Para ser capaces de delimitar una población de varicosidades que se pudiesen contar de una forma insesgada, consistente y reproducible, las varicosidades se clasificaron en dos poblaciones, *d* y *q*, de acuerdo con los siguientes criterios: varicosidades bien *diferenciadas* (*d*) en las que se incluyeron los perfiles de tamaños grandes y medios, que eran fácilmente identificables, más aquellos perfiles marcados que, aun siendo pequeños, representaban un ensanchamiento al menos del doble de diámetro de su axón visible (**Fig. 17**). El análisis de las mismas muestras realizado por dos personas distintas dio lugar a un grado notable de coincidencia en los resultados (en más de dos mil varicosidades de tipo *d* analizadas los valores se diferenciaron en un 5%). La segunda población de varicosidades, *cuestionable* (*q*), incluyó perfiles en forma de punto aislados y que no se podían asociar de forma obvia a ningún axón visible. Con toda probabilidad, el sesgo debido a pérdida de señal, disminución de la misma o solapamiento se debió a esta población *q* (Avendaño, 2006), y la habilidad para distinguir estas varicosidades pequeñas dependió en gran medida de la experiencia del observador.

Mediciones estereológicas

Se realizaron tres tipos de medidas en cada uno de los núcleos trigeminales del tronco del encéfalo para evaluar la extensión y la intensidad de la innervación de los aferentes primarios del DVN: (1) El volumen (*V*) de neuropilo ocupado por los axones y sus varicosidades se estimó mediante recuento de puntos aplicando el principio de Cavalieri (Gundersen et al. 1988), tanto en las secciones inmunomarcadas con CTB como en las inmunomarcadas con IB4. (2) El número total (*N*) de de varicosidades marcadas con CTB se estimó utilizando el fraccionador óptico (West et al. 1991). (3) La distribución de estas varicosidades de acuerdo con el tamaño aparente de su sección transversal máxima se estimó por medio del nucleador en 2D (Gundersen, 1988; Larsen, 1998). Todas las medidas se tomaron en un equipo estereológico integrado compuesto por un microscopio Olympus BX61 conectado a una cámara de vídeo de alta resolución Olympus DP71 (Olympus-Europa, Hamburg, Germany), y con un sistema computarizado con una platina motorizada de alta precisión (Prior Proscan II, Prior Scientific Inc., Rockland, MA) que permite una resolución de 0.1µm en el eje *z*. Las retículas interactivas de medida y el control de la

platina motorizada se realizaron a través del paquete informático de estereología NewCAST (Visiopharm, Hørsholm, Denmark).

Estimación del volumen del territorio innervado

Para la estimación del volumen de cada núcleo el tejido se muestreó con una retícula cuadrática de puntos que se superpuso en cada uno de los cortes. El volumen se calculó como el producto de la distancia media entre cada dos secciones consecutivas (d), el área asociada al punto [$a(p) = 3040 \mu m^2$], y la suma total de puntos contabilizados dentro del área correspondiente, siendo n el número de secciones estudiadas en cada animal.

$$V = d * a(p) * \sum_{i=1}^n p_i$$

Se utilizó un objetivo seco de 20X (Olympus UPLSAPO, NA=0.75) para identificar las varicosidades axónicas marcadas con CTB. Siempre que una varicosidad caía dentro de un radio de 4 μm respecto a cada punto, a cualquier nivel del espesor del corte, el punto se incluía en el recuento. El marcado con IB4 resultó ser más difuso, caracterizado por perfiles axónicos salpicado con pequeñas varicosidades que sólo se veían de forma clara en zonas con mucho marcado, por lo que la delimitación del territorio inmunomarcado fue menos precisa en la periferia, la zona con menor intensidad de marcado. En ninguna de las estimaciones se corrigieron los valores por el encogimiento del tejido.

Estimación del número total de varicosidades

Para el recuento de varicosidades y para su medición se utilizó el objetivo de inmersión en aceite de 100X (Olympus UPLSAPO, NA=1.4). Se aplicó un fraccionador para el muestreo, en tres etapas sucesivas: la serie de secciones (se usaron todas las secciones inmunomarcadas con CTB), el área de la sección y la profundidad de la sección. La fracción de muestreo total media obtenida fue de 1:56. La unidad de recuento se consideró el “ecuador” aparente de la varicosidad (el plano en el que se obtenía el máximo enfoque en la periferia de la varicosidad). En cada región se evaluó si el inmunomarcado se había producido a lo largo de todo el grosor de cada sección. Cuando el inmunomarcado se consideró débil en el 1/3 o 1/4 centrales, esta región del tejido se excluyó del recuento. Para evitar el sesgo potencial debido a las diferencias en el grosor de las secciones, la contribución de cada sección en el número final estimado se ponderó sistemáticamente por el número de varicosidades contadas en cada sección (Avendaño, 2006). Excluyendo la lámina II en Sp5c, se contaron una media de 736 varicosidades por núcleo y por caso, desde un mínimo de 270 (en el Sp5c de los controles) hasta un máximo de 1058 (en el Sp5c del grupo T).

Estimación del tamaño de las varicosidades

El tamaño de las varicosidades se analizó en tres animales representativos de cada grupo, realizando un muestreo sistemático en cada núcleo del trigémino. La observación del tejido mostró que las varicosidades no esferoidales no tenían ninguna orientación preferente, por lo que se asumió la isotropía. Por tanto, se utilizó el nucleador isotrópico en 2D para estimar el área transversal máxima de cada varicosidad. Se midieron unas 200 varicosidades por núcleo y por caso.

Análisis de datos

Western blot

El análisis de datos de los Western blots se realizó utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5.03. Primero se comprobó la existencia de valores estadísticos atípicos con el Test de Tukey y se eliminaron sólo los valores atípicos extremos que son los que están tres veces por encima o por debajo del rango intercuartílico. Se comprobó la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilk y se aplicó el test paramétrico t-Student (de dos colas) pareado, para comparaciones entre lados dentro del mismo grupo experimental, y no pareado, para comparaciones entre grupos. El nivel de significación se fijó para un valor de $P < 0,05$. Los valores de variación en la expresión de proteínas se representaron como la media + error estándar de la media (SEM). En las comparaciones entre lados dentro del mismo grupo experimental se estableció el lado derecho como el 100%. Las representaciones gráficas se llevaron a cabo con el programa Excel (Microsoft Office Professional Plus 2010 para Windows 10, ver. 14.0.7177.5000).

Microarray

El análisis de datos del microarray se realizó en el portal web facilitado por el fabricante del mismo para este objetivo:

www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php.

La cuantificación se hizo utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. Debido a que existe una relación inversamente proporcional entre el ciclo umbral (C_t , *threshold cycle*) y el nivel de expresión original del gen, y a que el producto se duplica con cada ciclo, el nivel de expresión original (L) para cada gen de interés se puede expresar como:

$$L = 2^{-C_t}$$

Para normalizar el nivel de expresión de un gen de interés (GOI) con respecto al de un gen de expresión constitutiva (HKG), se dividieron los niveles de expresión de los dos genes:

$$\frac{2^{-Ct(GOI)}}{2^{-Ct(HKG)}} = 2^{-[Ct(GOI)-Ct(HKG)]} = 2^{-\Delta Ct}$$

Para determinar el nivel de cambio (*fold change*) en la expresión génica, la expresión normalizada del gen de interés en la muestra experimental se dividió por la expresión normalizada del mismo gen de interés en la muestra control:

$$\frac{2^{-\Delta Ct(expt)}}{2^{-\Delta Ct(control)}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dónde $\Delta\Delta Ct$ es igual a $\Delta Ct(expt) - \Delta Ct(control)$.

De entre los genes de expresión constitutiva presentes en el array se seleccionó uno (Hprt1), que se expresaba de manera estable en ambos lados de los tres grupos experimentales, para realizar la normalización. Para considerar que un gen mostraba un nivel de expresión diferencial se seleccionó arbitrariamente un límite de cambio de ≥ 2 y ≤ 2 en la ratio de expresión. Por otro lado, se estableció un límite de 30 ciclos para asegurar la fiabilidad de la RT-PCR según recomendación del fabricante. Tras aplicar este criterio, 18 de los 84 genes presentes en el microarray se excluyeron del análisis posterior. Los gráficos de dispersión se obtuvieron usando el portal web previamente mencionado y el resto de resultados se presentó en tablas realizadas con el programa Word (Microsoft Office Professional Plus 2010 para Windows 10, ver. 14.0.7177.5000) y un diagrama realizado con el programa CorelDraw X3.

Esterología

Estimación del Coeficiente de Error

La precisión de la estimación del V y del N se midió calculando el coeficiente de error (CE) descrito para los muestreos aleatorios sistemáticos (Cruz-Orive 1999). Los CE obtenidos de las estimaciones de volumen de los núcleos con varicosidades oscilaron entre el 3% (para los núcleos con mayor inervación) y el 14% (para Sp5o, el núcleo con menos inervación). La media de los CE estimados en el caso del recuento de varicosidades varió desde el 1,5% (para todo el conjunto de varicosidades tipo *d*) hasta el 8% (en el caso de los recuentos en Sp5o y en Pr5 en los grupos C y T).

Análisis estadísticos adicionales

Los estadísticos descriptivos para V y N por núcleo y grupo (media y SEM) se obtuvieron del programa Excel (Microsoft Office Professional Plus 2010 for Windows 10,

ver. 14.0.7177.5000). Para las comparaciones entre grupos se usó el modelo lineal general univariante provisto por SPSS (ver. 15.0 para Windows). La homogeneidad de las varianzas se evaluó con el test de Levene. Cuando el estadístico F global del test mostró diferencias significativas, se aplicaron correcciones *post-hoc* usando el test de Scheffé o el T3 de Dunnet's. La distribución de las varicosidades teñidas con CTB en los cuatro núcleos trigeminales se representaron en Excel, y se compararon utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov (Kirkman, 1996) para dos muestras con el grupo C y con cada uno de los otros dos grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Inervación terminal en los núcleos del trigémino de los aferentes del DVN de C1 en animales controles

Captación y colocalización de los trazadores

En las primeras inyecciones realizadas hubo una notable variación en la densidad de terminales marcados en los núcleos del trigémino en cada uno de los grupos, por lo que éstas no se incluyeron en el estudio. Cuando el procedimiento quirúrgico y la inyección se perfeccionaron sólo se detectaron pequeñas variaciones en la intensidad del marcado, mientras que, el patrón regional y laminar de distribución de marcado entre los distintos núcleos del complejo trigeminal se mantuvo constante dentro de cada grupo. Para establecer en qué orden los trazadores inyectados eran captados por los axones del DVN, se recogió y se inmunotizó en varios casos tanto el TG como secciones transversales a 1-2 mm del sitio de inyección del DVN del bigote C1. El marcado axonal en el nervio y en las neuronas del ganglio fue muy débil o prácticamente indetectable cuando los animales sobrevivían durante 4 días. Por lo tanto, se repitió la inyección en dos ratas control a las que se dejó sobrevivir únicamente 24 horas. En estos casos se detectó un marcado muy extenso de CTB en axones presumiblemente mielínicos del DVN, así como un razonable número de cuerpos neuronales marcados con CTB e IB4 en el TG. Sólo en unas pocas neuronas aisladas se encontró colocalización de los dos trazadores (**Fig. 9**).

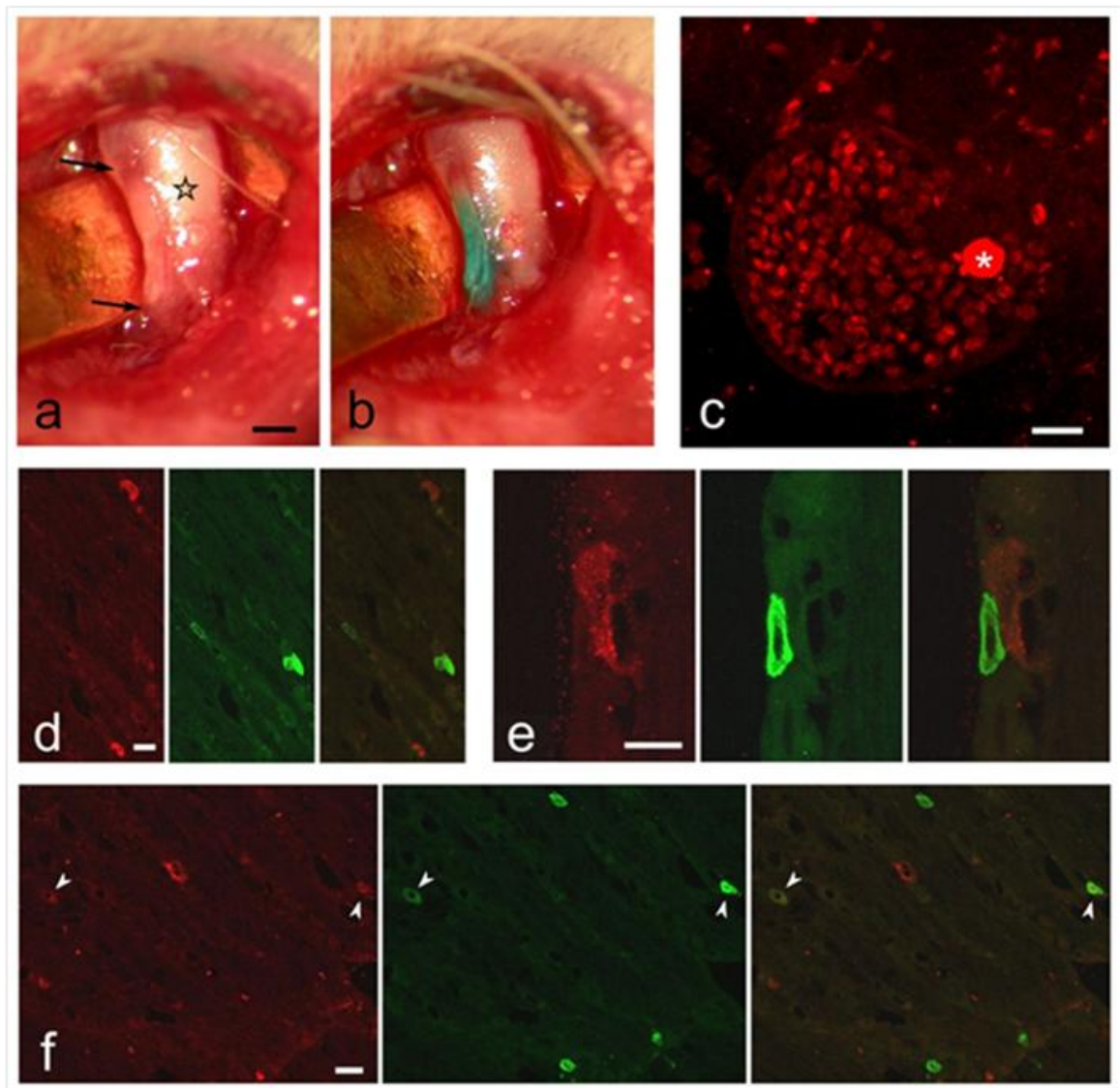


Figura 9: Inyección de CTB e IB4 en el nervio profundo (DVN) de la vibrisa C1. **(a)** Nervio profundo de la vibrisa C1 expuesto durante la cirugía. Estrella: folículo; Flechas: porción del DVN pegada a la pared del folículo. **(b)** Depósito intraneural con la mezcla de los trazadores y el colorante Verde Luz para facilitar la visualización de la zona de inyección; la foto se tomó inmediatamente después de realizar la inyección. **(c)** Imagen de microscopía confocal de una sección transversal a 2 mm de la zona de inyección del DVN de C1. Prácticamente todos los axones de tamaño medio y grande están marcados con CTB (rojo). El asterisco indica un artefacto debido a un vaso sanguíneo. **(d, e)** Imágenes en las que se observan somas neuronales en el TG en un caso control marcados únicamente con uno de los trazadores, CTB (rojo, izquierda) o IB4 (verde, medio). Las imágenes fusionadas se encuentran a la derecha y en ellas se puede observar que no hay colocalización de los trazadores. **(f)** Se observó colocalización en un número muy limitado de neuronas en el mismo caso (puntas de flecha). *Barra de calibración:* 200 μm (**a** y **b**), 20 μm (**c**), 40 μm (**d-f**).

También se comprobó la colocalización de los trazadores en el núcleo Sp5c en el tronco del encéfalo. Las imágenes obtenidas con el microscopio confocal de las dobles inmunofluorescencias en las secciones de tronco indicaban que prácticamente ninguna de las fibras y varicosidades marcadas con CTB localizadas en las láminas III-IV de este núcleo contienen también IB4. Sin embargo, de entre el pequeño número de perfiles marcados con CTB que coinciden topográficamente en la lámina II con los marcados con IB4, se encontró algún ejemplo aislado de colocalización CTB-IB4, y estos perfiles, en general, parecían ser fibras finas con varicosidades pequeñas (**Fig. 10**).

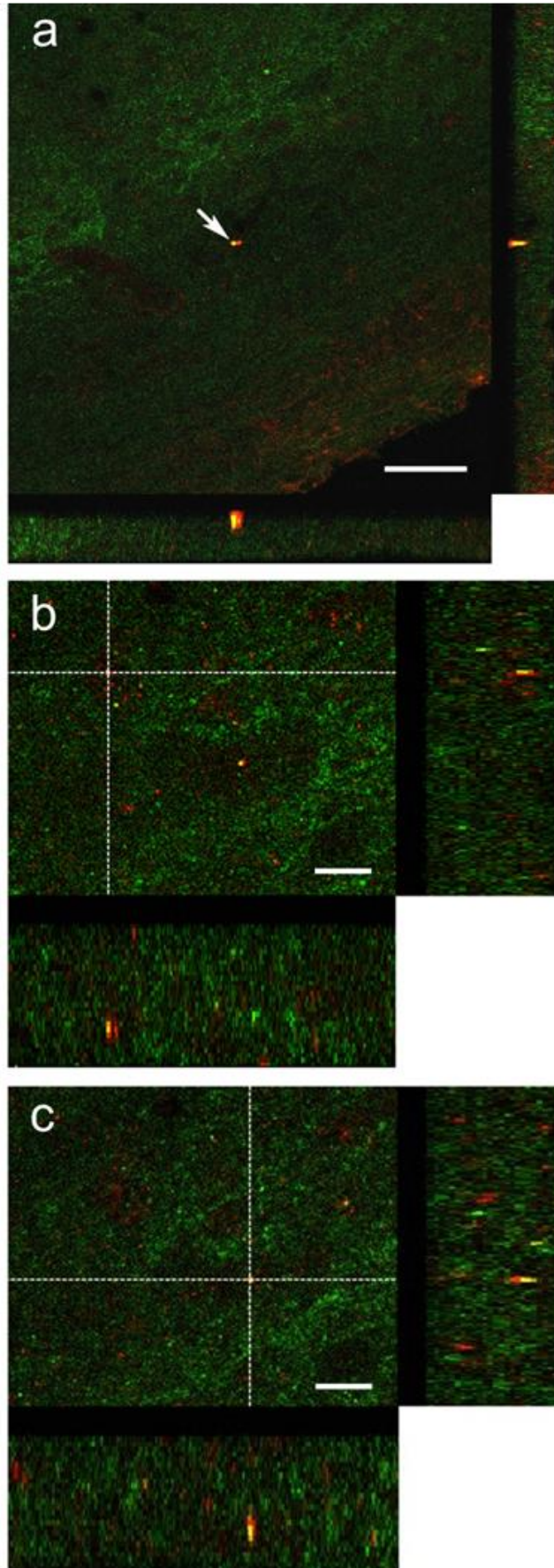


Figura 10: Imágenes de microscopía confocal y proyecciones ortogonales en las que se muestran tres ejemplos de varicosidades doblemente marcadas para CTB (rojo) y para IB4 (verde) en la lámina II del Sp5c en un caso control. **(a)** Ejemplo de una varicosidad de tamaño relativamente grande doblemente marcada (flecha) localizada en la proximidad de otra varicosidad que sólo está marcada con CTB. **(b, c)** El punto donde se localiza la cruz indica dos varicosidades pequeñas doblemente marcadas. *Barras de calibración:* 50 μm **(a)**, 10 μm **(b, c)**.

Patrones de inervación nuclear en controles

La distribución de los terminales marcados con CTB se produjo a lo largo de una columna alargada rostrocaudalmente, esta comenzaba en la parte más rostral del Pr5 y terminaba en la lámina III del Sp5c a unos 3,5 mm del óbex (**Fig. 11**). Estos parches estaban formados por axones y varicosidades tanto terminales como de paso, de distinto tamaño muy densamente marcados. La columna de marcado se localizaba de forma continua y alargada tanto en la dimensión dorsoventral como mediolateral en los núcleos Pr5, Sp5o y Sp5ip (**Fig. 11**). En el núcleo Sp5c (**Fig. 12**), el marcado estaba separado del que se encontraba en el núcleo Sp5ip por una pequeña región sin tinción, y se extendía en mayor grado en ambas direcciones: rostralmente, estaba prácticamente localizado en la lámina IV, con algunas varicosidades diseminadas en la lámina V; caudalmente, cambiaba a una posición más superficial, ocupando los 2/3 más profundos de la lámina III. En 3 casos controles de los 8 casos totales analizados, también se observó en los 2/3 más internos de la lámina II de Sp5c una cantidad variable de varicosidades pequeñas marcadas con CTB (**Fig. 14**).

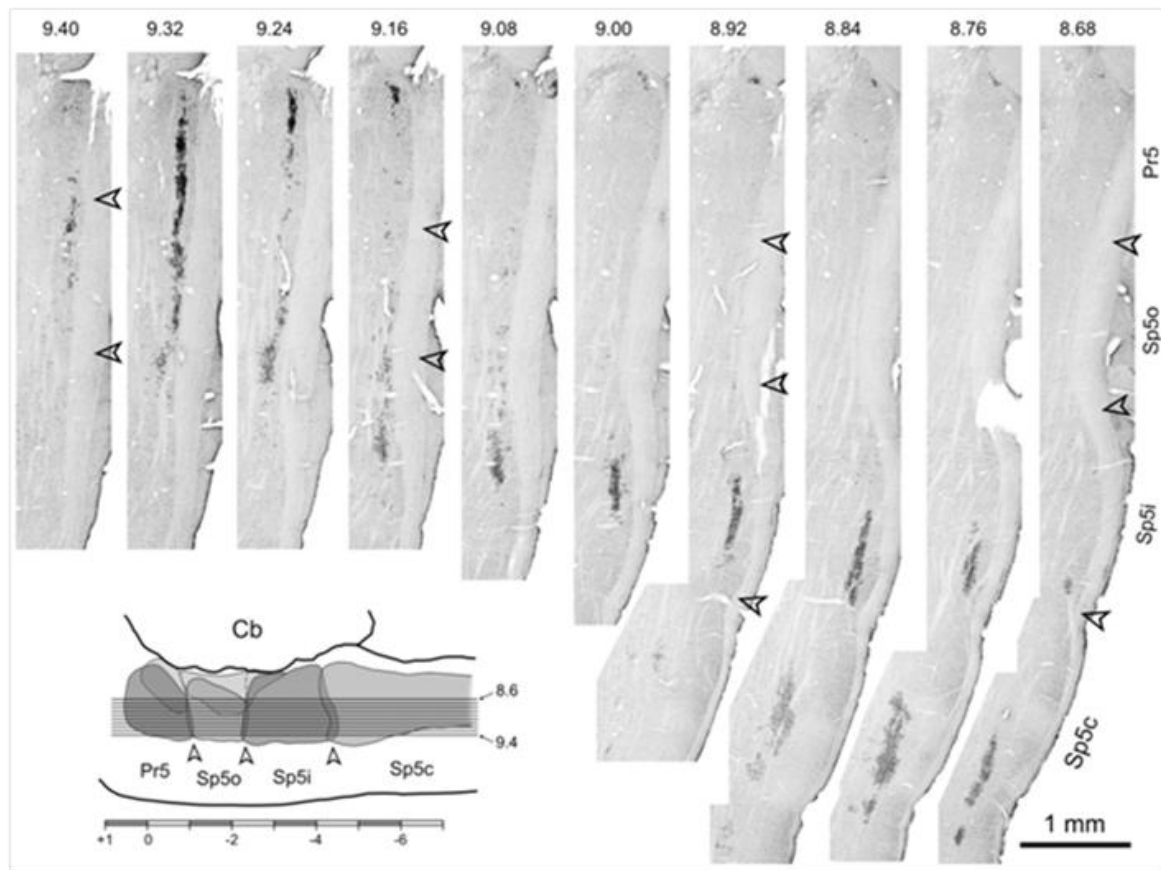


Figura 11: Distribución de las áreas de proyección en los núcleos trigeminales del tronco del encéfalo de axones terminales del DVN de C1 marcados con CTB en un caso control. Se muestra el marcado en una de cada dos secciones horizontales, el contraste y el brillo se ajustaron para facilitar la visualización del marcado. La localización dorsoventral aproximada de cada sección se indica en el recuadro (esquina inferior izquierda), y las coordenadas estereotáxicas de las posiciones horizontales se obtuvieron de Paxinos y Watson (1998). Las cabezas de flecha indican los bordes aproximados de cada núcleo.

El marcado con IB4 se encontró restringido únicamente al núcleo Sp5c, con fibras y varicosidades muy finas, y formando un parche alargado de menos de 1 mm de largo, limitado a la lámina I y a los 2/3 más externos de la lámina II (**Fig. 12**).

Tanto en el material revelado con DAB como en el material revelado con fluorescencia, se observaron numerosas fibras marcadas con CTB en la mitad más externa del tracto del trigémino (**Fig.12**).

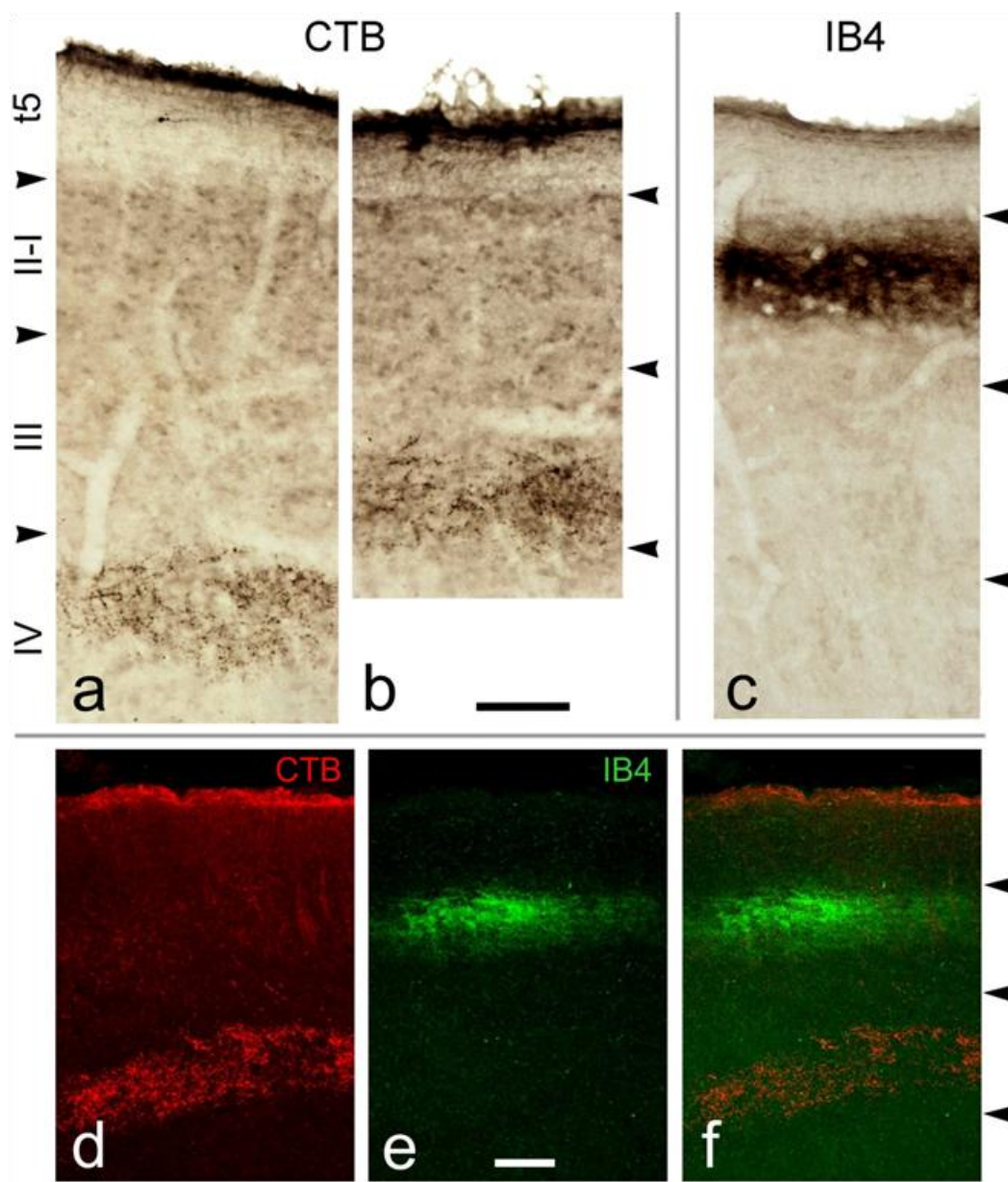


Figura 12: Patrón de innervación terminal en el núcleo Sp5c de aferentes del DVN de C1 marcados con CTB e IB4 en un caso con recorte de vibrisas (**a-c**) y en un caso control (**d-f**). En secciones horizontales del tronco del encéfalo reveladas con DAB, los terminales marcados con CTB forman un parche denso en la lámina IV (**a**, más rostral) y III (**b**, más caudal). Las fibras marcadas con IB4 se concentran en la lámina II, con mayor intensidad en sus dos tercios más externos (**c**). El mismo patrón laminar se encontró con la doble inmunofluorescencia para CTB (**d**, rojo) e IB4 (**e**, verde) en un caso control. Los terminales marcados con IB4 se encuentran restringidos a la lámina II, y se observa un marcado denso correspondiente a CTB, en el tracto del trigémino y en las láminas III-IV. También se puede ver un marcado difuso con CTB en las láminas I-II en el caso control, que en ocasiones, forma un continuo desde el tracto de fibras hasta los terminales en la lámina III. (**f**) Imagen fusionada en la que se observa el marcado para ambos trazadores. Las puntas de flecha indican límites entre láminas. *Barra de calibración:* 100 μ m.

Cambios en la inervación terminal de los aferentes primarios de una única vibrisa tras modificaciones de la entrada sensorial

Las modificaciones de la entrada sensorial sostenidas en el tiempo producen cambios en el cerebro, estas transformaciones se han estudiado de forma exhaustiva en centros superiores mientras que la implicación de las neuronas sensoriales primarias en estos cambios plásticos ha quedado relegada a un segundo plano. En este trabajo hemos querido dedicar nuestra atención al estudio de estas terminaciones primarias y a su participación en la plasticidad dependiente de entrada sensorial. Con ese fin, se han analizado tanto cualitativamente como cuantitativamente los axones terminales centrales de una población de neuronas del TG cuyos axones periféricos inervan una única vibrisa. Para ello, se realizaron inyecciones en el DVN de la vibrisa C1 con una mezcla de dos trazadores, CTB e IB4, los cuales marcan fibras mielínicas y amielínicas respectivamente, en tres grupos de animales adultos jóvenes: controles, animales sometidos a privación del tacto háptico por recorte de vibrisas y animales expuestos a un ambiente enriquecido. A continuación, se estudió el patrón de terminación laminar y las arborizaciones de estas neuronas primarias en los núcleos del complejo trigeminal del tronco del encéfalo, seguido del estudio del número y tamaño de sus varicosidades.

Patrón de inervación terminal en los núcleos del trigémino tras enriquecimiento y recorte de vibrisas

Tras el recorte unilateral de vibrisas o la exposición a un ambiente enriquecido, no se observaron cambios obvios con respecto a los controles a baja magnificación ni en la distribución de los terminales marcados con CTB e IB4 en los núcleos Pr5, Sp5o, Sp5ip ni en su distribución laminar en el núcleo Sp5c (**Fig. 13**). Cuando el marcado se observa a mayor magnificación, sin embargo, las regiones inmunomarcadas con CTB son más densas y contienen un mayor número de varicosidades, en particular en el grupo de enriquecimiento.

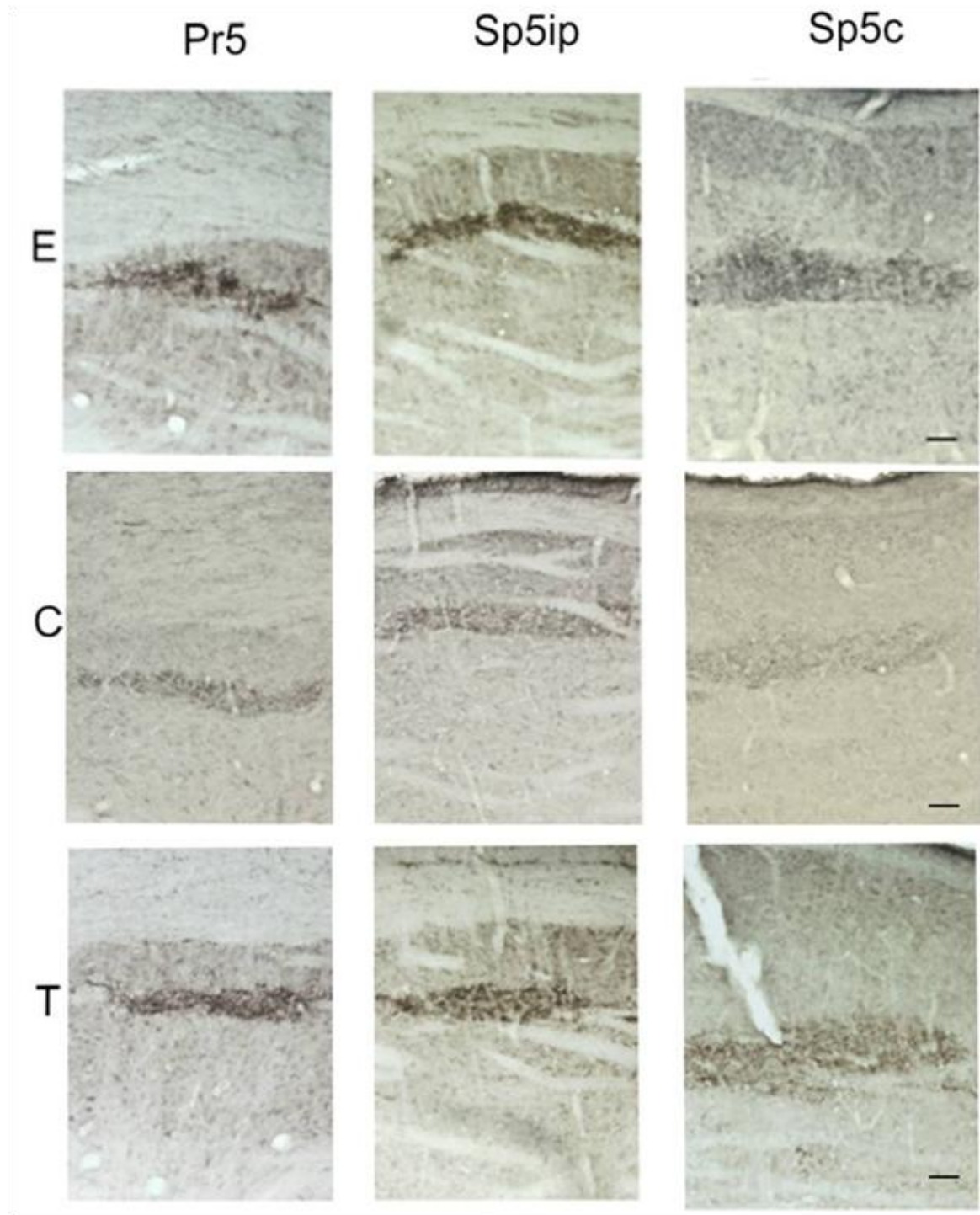


Figura 13: Ejemplo de patrón de terminación de fibra marcadas con CTB a baja magnificación (10X) en el núcleo principal (Pr5), el núcleo interpolar (Sp5ip) y el núcleo caudal (Sp5c) en un animal con recorte de vibrisas (T), control (C) y un animal enriquecido (E). En las imágenes se puede observar que tanto el patrón de terminación como su localización laminar se mantiene en los tres grupos y que la densidad del marcado es mayor en los grupos T y E que en el grupo C. *Barra de calibración:* 100 μ m.

Además, la presencia de terminales y varicosidades marcados con CTB aumentaba notablemente en la lámina II del núcleo Sp5c cuando la entrada sensorial estaba alterada, tanto por privación como por enriquecimiento (**Fig. 14**). Estas varicosidades fueron en su mayoría de tamaño pequeño o mediano y se observaron en todos los casos en los grupos de E y de T (n=6 en cada grupo).

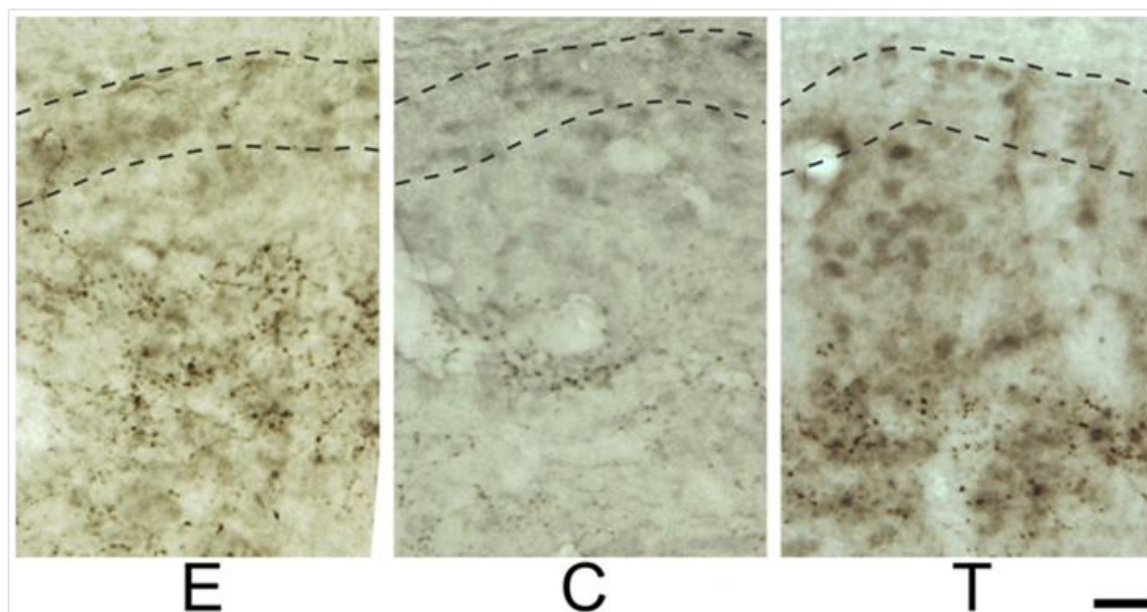


Figura 14: Ejemplos de axones terminales y varicosidades marcados con CTB en las láminas I y II de Sp5c en controles (C) y en los grupos experimentales (E y T). El caso control corresponde a uno de los que presenta una de las densidades de innervación más densas en la lámina II dentro de este grupo. Los casos de los grupos E y T son ejemplos representativos de lo que sucede en cada uno de estos grupos. Las líneas discontinuas delimitan de forma grosera la lámina I; el tracto del trigémino aparece en la parte superior, y la lámina II en la parte inferior de las imágenes. *Barra de calibración:* 20 μ m.

El análisis cuantitativo no mostró cambios en el volumen del territorio innervado en ninguno de los núcleos en el grupo T, sin embargo, se observó una tendencia generalizada de aumento de volumen en el grupo E, esta tendencia alcanzó la significación estadística cuando se consideró el volumen de todos los núcleos en conjunto (**Fig. 16**). El volumen del área marcada con IB4 no presentó cambios ni en el grupo T ni en el grupo E con respecto al grupo C (**Fig. 15**).

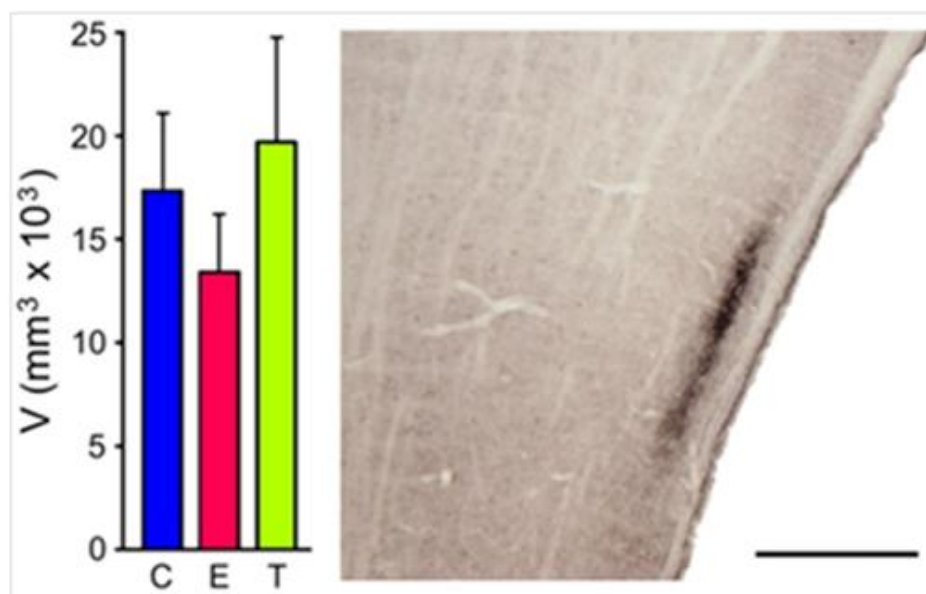


Figura 15: Volumen del neuropilo innervado por terminales provenientes del DVN de C1 marcados con IB4 en millones de micras cúbicas (izquierda). El parche de marcado estaba restringido a la lamina II de Sp5c, tal y como se muestra en un caso del grupo T en la extensión máxima de su marcado (derecha). Los valores representan medias+SEM y cada grupo tienen asignado un color; el grupo control azul (C, $n=8$), el grupo enriquecido magenta (E, $n=6$) y el grupo trimming verde (T, $n=6$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. *Barra de calibración:* 500 μm .

Por otro lado se analizó el número de varicosidades clasificadas como distinguibles (d) previamente (ver Material y Métodos). El número de varicosidades tipo d fue significativamente mayor en todos los núcleos en el grupo E, y en el núcleo Sp5c en el grupo T, comparado con los controles (**Fig. 16**). El aumento medio en el grupo E fue de un 64% en Sp5ip y de un 120% en Pr5. En el Sp5c, el número de varicosidades aumentó un 88% y un 63% en los grupos E y T respectivamente. Estas diferencias estadísticamente significativas entre grupos no se observaron cuando todas las varicosidades (distinguibles y cuestionables) se incluyeron en el recuento. No se pudieron cuantificar las varicosidades marcadas con IB4 debido a que, por su pequeño tamaño la mayoría hubiesen quedado por debajo de la resolución del microscopio óptico, o en la categoría de varicosidades cuestionables (q), o simplemente ocultas por el difuso inmunomarcado del neuropilo.

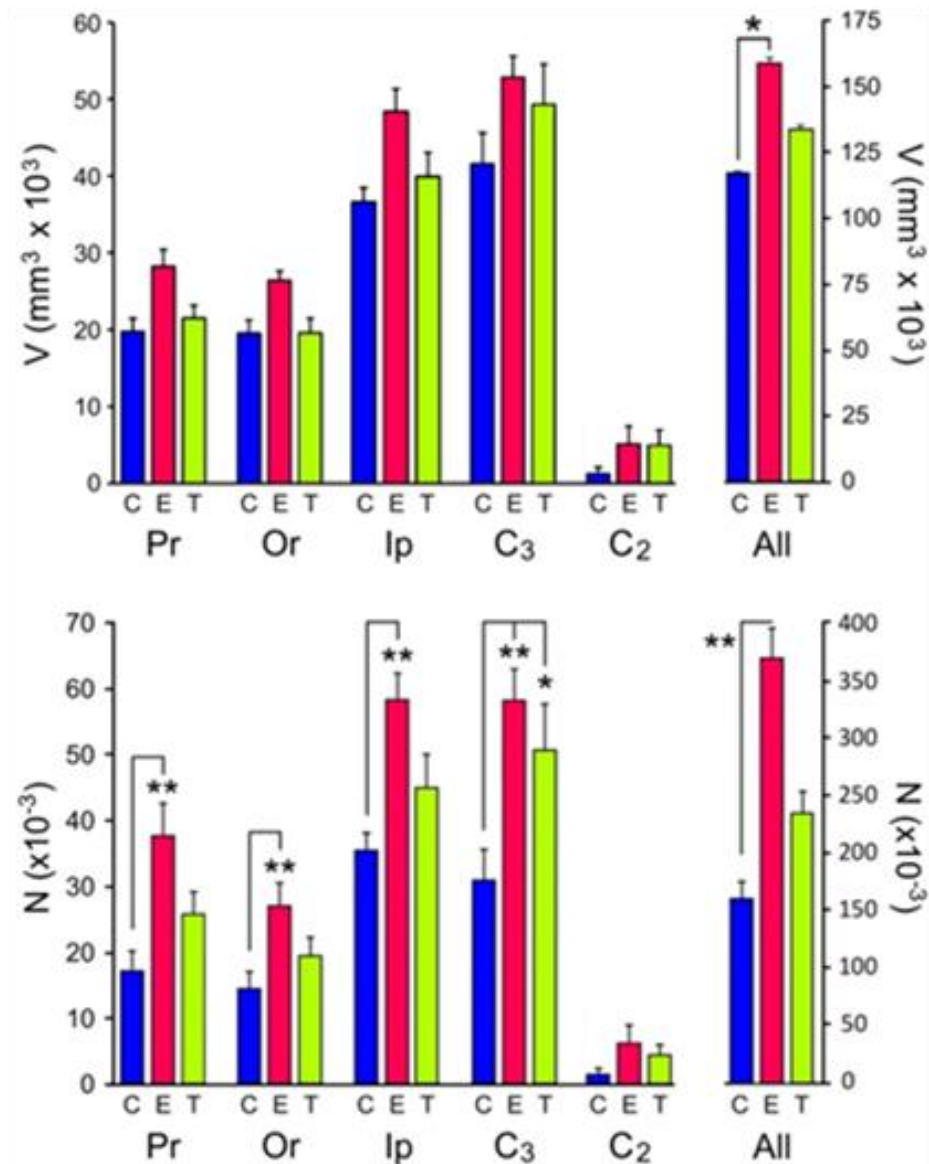


Figura 16: Volumen del neuropilo inervado por los terminales aferentes primarios del DVN de la vibrisa C1 en millones de micras cúbicas (arriba), y número total de varicosidades distinguibles (d) en miles (abajo). Los valores representan medias+SEM y cada grupo tienen asignado un color; el grupo control azul (C, n=8), el grupo enriquecido magenta (E, n=6) y el grupo trimming verde (T, n=6). Las diferencias estadísticamente significativas representan $0,01 < p < 0,05^*$ y $p < 0,005^{**}$. C₂, lámina II de la división caudal del núcleo espinal, C₃, láminas III y IV de la división caudal del núcleo espinal, Ip, núcleo interpolar Or, núcleo oral, Pr, núcleo principal, All, todos los núcleos tomados en conjunto.

Tamaño de las varicosidades

Las varicosidades en primer lugar, se clasificaron como pertenecientes a una de las dos poblaciones establecidas, *d* o *q*. Entre las varicosidades distinguibles (*d*) se incluyen los perfiles de tamaño grande y medio, que son fácilmente identificables, más aquellos perfiles marcados que, aun siendo pequeños, representan un ensanchamiento al menos del doble de diámetro de su axón visible. La segunda población de varicosidades, cuestionable (*q*), incluye perfiles en forma de punto aislados y que no se pueden asociar de forma obvia a ningún axón visible (**Fig. 17**). Una vez clasificadas y muestreadas de forma sistemática, se midió su sección transversal máxima con el nucleador en 2D. El solapamiento de tamaño estimado entre las dos clases fue inferior al 5% de todas las varicosidades. Se estableció que las varicosidades de tipo *d* tenían que tener un mínimo de $0,20 \mu\text{m}^2$ en el área de la sección, ya que sólo de forma muy aislada alguna varicosidad asignada a la población *q* excedía ese área.

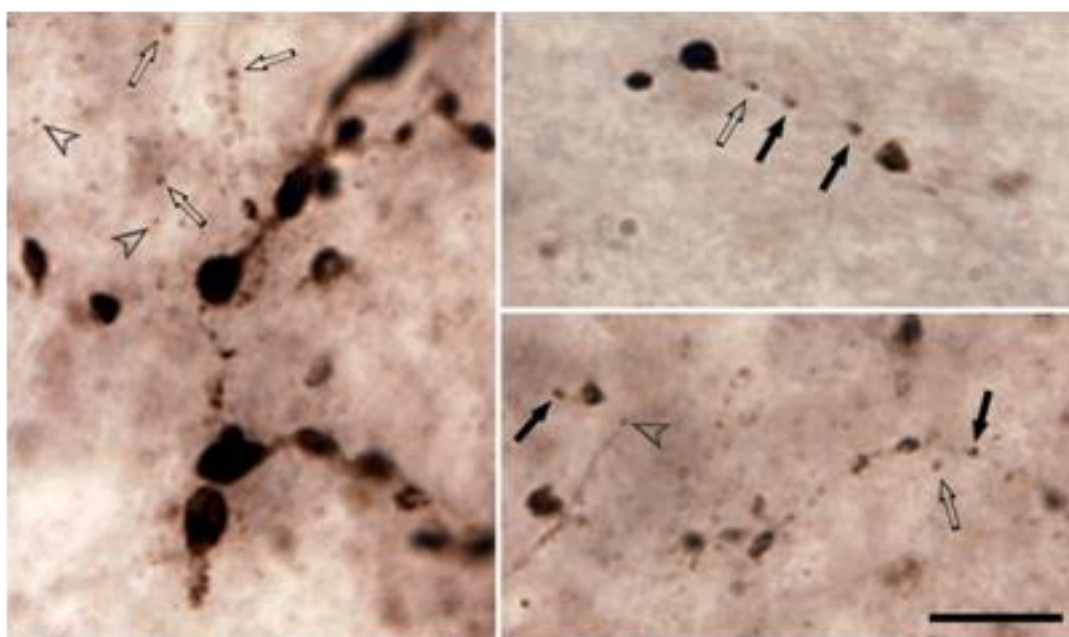


Figura 17: Ejemplos de varicosidades marcadas con CTB en el núcleo caudal del trigémino. Las varicosidades de tamaño grande y mediano son fácilmente reconocibles y constituyen la gran mayoría de las varicosidades pertenecientes a la población de varicosidades *d*. Las varicosidades de tamaño pequeño se observan como abultamientos a lo largo de los axones (las flechas negras indican algunos ejemplos). Los perfiles aislados de tamaño pequeño se clasificaron como pertenecientes a la población de varicosidades *q*, se veían como perfiles muy pequeños aparentemente asociados a axones muy finos (flechas sin relleno). Otros perfiles puntiformes muy pequeños que se encontraban diseminados por el neuropilo no se incluyeron en el recuento (algunos ejemplos está indicado con las cabezas de flecha). *Barra de calibración:* 10 μm .

Los distintos tamaños de las varicosidades en todos los grupos se distribuyeron de forma unimodal, con un marcado sesgo hacia la derecha, y con una diferencia de dos órdenes de magnitud ($0,2$ a $20 \mu\text{m}^2$) entre los valores extremos. La mediana de los valores de tamaño en los controles, se mantuvo en unas $1,34$ - $1,65 \mu\text{m}^2$ (**Tabla 1**), un tamaño bastante moderado. Este valor se vio afectado por las modificaciones en la entrada sensorial, aumentando entre un 18% y un 45% en los grupos E y T comparado con los controles en los núcleos Pr5, Sp5ip y Sp5c. Por el contrario, las varicosidades en el núcleo Sp5o mostraron valores similares independientemente de las modificaciones en la entrada sensorial. Cuando se realizó una comparación estadística entre estas distribuciones con el test de Kolmogorov-Smirnov, los resultados indicaron que el efecto era más fuerte y generalizado en el caso del enriquecimiento, con un aumento de tamaño significativo en todos los núcleos con respecto a los controles (menos el Sp5o), mientras que el aumento de tamaño después de la privación del tacto háptico sólo apareció en el núcleo Sp5ip y en las láminas III-IV del núcleo Sp5c (**Fig. 18**). De hecho, el aumento de tamaño en el Sp5ip en el grupo T fue significativamente menor ($p=0,025$) que en el grupo E (datos no mostrados).

Tabla 1: Estadística descriptiva del tamaño de la sección transversal de distintas varicosidades marcadas con CTB en los núcleos del trigémino. ^a datos de tres animales tomados en conjunto.

| | N de varicosidades examinadas ^a | | | Media (μm^2) | | | Mediana (μm^2) | | |
|-------|--------------------------------------------|-----|-----|---------------------------|------|------|-----------------------------|------|------|
| | C | E | T | C | E | T | C | E | T |
| Pr5 | 619 | 593 | 642 | 2,22 | 2,80 | 2,48 | 1,64 | 1,93 | 1,93 |
| Sp5o | 627 | 422 | 689 | 2,14 | 2,15 | 2,12 | 1,62 | 1,61 | 1,62 |
| Sp5ip | 438 | 678 | 723 | 1,82 | 2,50 | 2,51 | 1,34 | 1,94 | 1,87 |
| Sp5c | 578 | 759 | 717 | 2,06 | 2,44 | 2,63 | 1,65 | 1,95 | 2,12 |

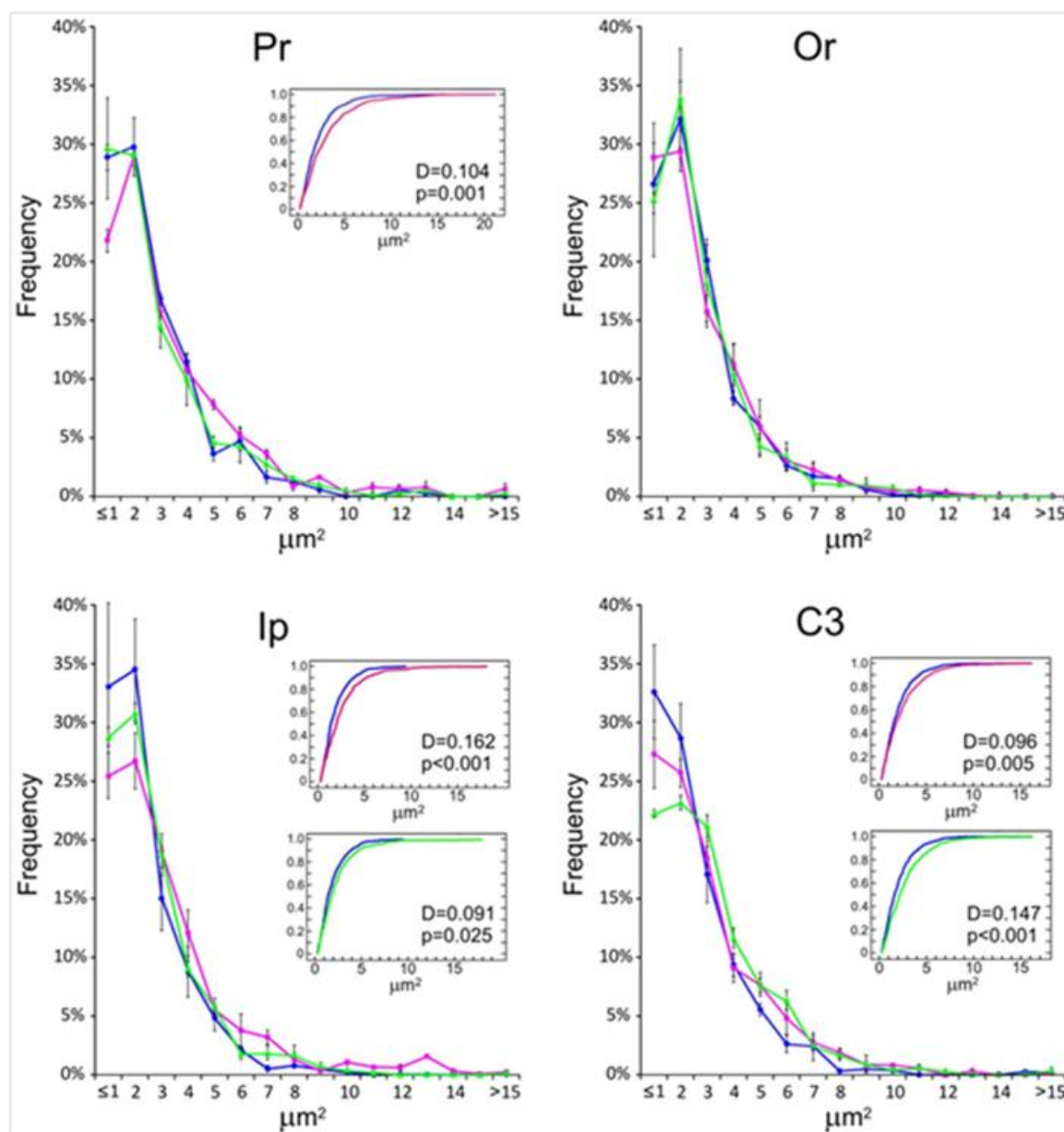


Figura 18: Distribución de varicosidades distinguibles (*d*) marcadas con CTB en los núcleos del trigémino, agrupadas en dieciséis clases de acuerdo con su área transversal máxima. Las clases 2-15 representan aumentos de tamaño de entre 1,1 y 15 micras cuadradas, en incrementos de una micra cuadrada cada vez. La clase 1 recoge varicosidades con un área de sección máxima de 0,2-1,0 micras cuadradas. Las curvas representan la media \pm SEM de tres casos representativos por cada grupo, con el mismo código de colores que en las demás figuras (C, azul; E, magenta; T, verde). La distribución del grupo C se comparó con la de los otros dos grupos con el test de Kolmogorov-Smirnov. Cuando se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), se mostraron las curvas acumulativas en los recuadros.

Cambios en las bases moleculares de la transmisión glutamatérgica en el ganglio trigémino tras modificaciones en la entrada sensorial

Como ya se ha comentado de forma extensa en la introducción de esta tesis, la plasticidad dependiente de experiencia, y en particular, en el caso que nos ocupa, de la experiencia somatosensorial, induce cambios duraderos en la estructura de las sinapsis, dendritas y axones. Estos cambios se producen tanto a nivel anatómico como molecular, sin embargo, aunque estos cambios moleculares han sido relativamente bien estudiados en la corteza, se conoce bastante poco sobre los posibles mecanismos moleculares responsables de los cambios plásticos dependiente de experiencia a niveles periféricos de las vías sensoriales. Dada la importancia de la transmisión glutamatérgica en los sistemas somatosensoriales y su participación en los fenómenos de plasticidad, en esta tesis, nos planteamos el estudio tanto a nivel génico como a nivel proteico, de una serie de receptores y de proteínas asociadas a la transmisión glutamatérgica en el TG de ratas macho adultas sometidas a modificaciones de la entrada sensorial. El estudio se realizó en animales controles, animales con recorte de vibrisas y en animales sometidos a un ambiente enriquecido.

Cambios a nivel génico

Expresión de genes relacionados con plasticidad sináptica

Controles (Grupo C)

Del total de 66 genes estudiados, 16 mostraron una diferencia de al menos 2 veces su ratio de expresión, entre el lado derecho y el lado izquierdo del TG en los animales controles. Entre estos genes diferencialmente expresados se encontraban genes de expresión temprana, implicados en LTP o LTD, y genes que codifican para moléculas de adhesión celular y receptores neuronales. En todos los casos en los que se detectaron diferencias, los niveles de expresión fueron más elevados en el lado izquierdo del TG (Tabla 2, Fig. 19a, Fig. 20).

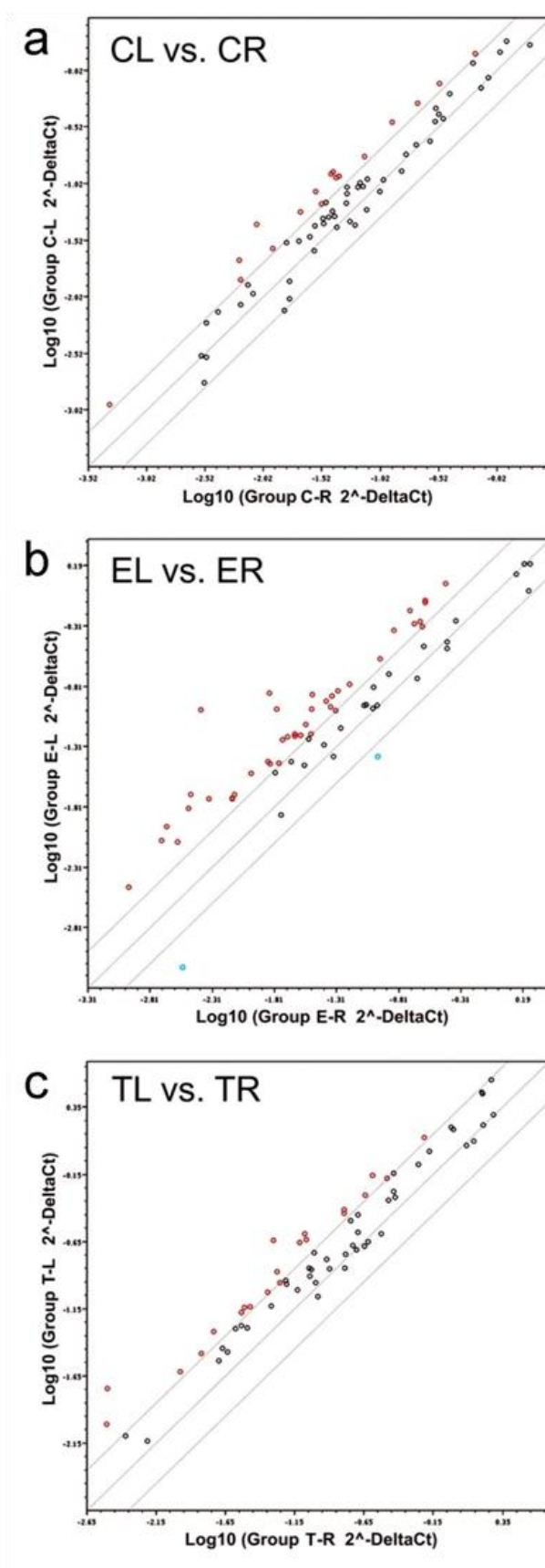


Figura 19: Gráficos de dispersión en los que se muestra la expresión de los 66 genes de interés en el TG. El perfil de expresión se representa como el $\log_{10}(2^{-\Delta\text{Ct}})$ en el lado izquierdo y derecho del TG en Controles (a), Enriquecidos (b), y Trimming (c). La línea media indica que el mRNA se expresa igual en los dos lados. Las líneas por encima y por debajo de la línea media representan los valores de corte de 2 veces la ratio de expresión; los puntos que se encuentran por encima (rojo) o por debajo (azul) de esas líneas indican un aumento o una disminución de la expresión de los genes respectivamente.

Recorte de vibrisas (Grupo T)

Comparado con las asimetrías entre el lado derecho e izquierdo que se encontraron en controles, el recorte de vibrisas continuado en el tiempo en el lado derecho produjo un aumento en el número de genes que se sobreexpresaban en el lado izquierdo con respecto al lado derecho (21/66). Catorce de estos genes coincidían con los que aumentaban su expresión en el lado izquierdo en el grupo E, mientras que sólo 3 genes que aumentaron su expresión en el lado izquierdo en el grupo T (*Cnr1*, *Fos*, and *Grip1*) se solaparon con aquellos genes que se sobreexpresaban en el lado izquierdo en el grupo C (**Tabla 2, Fig. 19c, Fig.20**).

Ambiente enriquecido (Grupo E)

El número de genes que mostraron expresión diferencial entre lados (43/66) en el grupo de animales sometidos a una exposición crónica por enriquecimiento ambiental, aumentó hasta casi tres veces comparado con el grupo control. Al igual que en los controles, la mayoría de genes (41/43) mostró una mayor expresión en el lado izquierdo (**Tabla 2, Fig. 19b, Fig. 20**), en estos genes se encontraban, entre otros, una gran variedad de genes de expresión temprana y genes relacionados con LTP y LTD (incluyendo varios genes relacionados con la transmisión glutamatérgica).

Tabla 2: Listado de genes estudiados en el microarray. Las tres columnas de la derecha muestran las diferencias en los ratios de expresión entre lados en el TG de los grupos controles, enriquecidos y trimming. Los valores en rojo y azul ponen de manifiesto diferencias de ≥ 2 de aumento o disminución en el ratio de expresión, respectivamente. CL=Control izquierdo; CR=Control derecho; EL=Enriquecido izquierdo; ER=Enriquecido derecho; TL=Trimming izquierdo; TR=Trimming derecho.

| Símbolo | Descripción | Ratio de expresión | | |
|---------------|----------------------------------------------------------------|--------------------|-------|-------|
| | | CL/CR | EL/ER | TL/TR |
| <i>Adam10</i> | Dominio 10 de la metalopeptidasa ADAM | 2.45 | 1.21 | -1.07 |
| <i>Adcy1</i> | Adenilato ciclasa 1 (cerebro) | -1.97 | -1.30 | 2.28 |
| <i>Adcy8</i> | Adenilato ciclasa 8 (cerebro) | -1.04 | 2.71 | 2.10 |
| <i>Akt1</i> | Homólogo 1 del oncogén viral de timoma murino V-akt | 1.08 | 2.40 | 2.01 |
| <i>Arc</i> | Proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad | -1.77 | 3.21 | 3.19 |
| <i>Bdnf</i> | Factor neurotrófico derivado del cerebro | -1.74 | 2.54 | 1.91 |
| <i>Camk2a</i> | Proteína kinasa II alfa dependiente de Calcio/Calmodulina | -1.31 | 2.71 | 1.38 |
| <i>Camk2g</i> | Proteína kinasa II gamma dependiente de Calcio/Calmodulina | -1.13 | 2.46 | -1.12 |
| <i>Cdh2</i> | Cadherina 2 | 1.52 | 1.30 | 1.49 |
| <i>Cebpd</i> | Proteína delta de Unión al Potenciador CCAAT | 1.90 | 1.74 | 2.71 |
| <i>Cnr1</i> | Receptor de Cannabinoides 1 (cerebro) | 2.69 | 2.99 | 4.57 |
| <i>Creb1</i> | Proteína 1 de unión al elemento de respuesta activado por AMPc | 3.19 | 2.89 | 1.13 |
| <i>Crem</i> | Elemento modulador de respuesta a AMPc | 1.52 | 2.01 | 2.87 |
| <i>Dlg4</i> | Discs, homólogo largo 4 (Drosophila) | 1.32 | 4.23 | 1.31 |
| <i>Egr1</i> | Gen de respuesta de crecimiento temprano-1 | 1.79 | 5.06 | 5.72 |
| <i>Egr2</i> | Gen de respuesta de crecimiento temprano-2 | 1.77 | 2.39 | 2.41 |

| | | | | |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------|-------|------|-------|
| <i>Egr3</i> | Gen de respuesta de crecimiento temprano-3 | 1.71 | 2.59 | 1.70 |
| <i>Ephb2</i> | Receptor 2 de la efrina tipo B | 1.02 | 3.09 | 2.29 |
| <i>Fos</i> | Oncogén del osteosarcoma FBJ | 3.38 | 1.90 | 2.21 |
| <i>Gabra5</i> | Receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA) A, alfa 5 | 1.26 | 1.94 | 1.87 |
| <i>Gnai1</i> | Proteína inhibitoria de unión a nucleótidos de guanina G-alfa 1 | 1.54 | 2.31 | 1.59 |
| <i>Gria1</i> | Receptor ionotrópico de Glutamato, AMPA 1 | 1.33 | 3.95 | 1.45 |
| <i>Gria2</i> | Receptor ionotrópico de Glutamato, AMPA 2 | 2.61 | 2.89 | -1.15 |
| <i>Gria3</i> | Receptor ionotrópico de Glutamato, AMPA 3 | -1.07 | 2.12 | 1.45 |
| <i>Gria4</i> | Receptor ionotrópico de Glutamato, AMPA 4 | 1.51 | 2.04 | 1.36 |
| <i>Grin1</i> | Receptor ionotrópico de Glutamato, N-metil D-aspartato 1 | 1.35 | 2.65 | 1.73 |
| <i>Grin2b</i> | Receptor ionotrópico de Glutamato, N-metil D-aspartato 2B | 1.82 | 4.30 | 1.21 |
| <i>Grip1</i> | Proteína de interacción con Receptores de Glutamato 1 | 2.24 | 2.91 | 2.16 |
| <i>Grm3</i> | Receptor metabotrópico de Glutamato 3 | 2.22 | 4.81 | 1.59 |
| <i>Grm4</i> | Receptor metabotrópico de Glutamato 4 | 1.54 | 2.47 | 2.00 |
| <i>Grm7</i> | Receptor metabotrópico de Glutamato 7 | -1.42 | 2.43 | -1.19 |
| <i>Grm8</i> | Receptor metabotrópico de Glutamato 8 | 1.39 | 3.12 | 1.53 |
| <i>Homer1</i> | Homer homólogo 1 (Drosophila) | 1.97 | 2.74 | 1.32 |
| <i>Igf1</i> | Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 | -1.17 | 2.60 | 1.79 |
| <i>Jun</i> | Oncogén Jun | 1.44 | 2.83 | 2.25 |
| <i>Junb</i> | Proto-oncogén Jun B | 1.30 | 6.01 | 2.59 |
| <i>Klf10</i> | Factor 10 tipo Kruppel | -1.22 | 2.64 | 2.36 |
| <i>Mapk1</i> | Proteína kinasa 1 activada por mitógenos | 1.03 | 3.05 | 1.66 |

| | | | | |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|
| <i>Ncam1</i> | Molécula de Adhesión celular neural 1 | 2.38 | 1.51 | -1.17 |
| <i>Nfkb1</i> | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas 1 | -1.20 | 1.28 | -1.01 |
| <i>Ngfr</i> | Receptor del factor de crecimiento nervioso (Miembro 16 de la superfamilia TNFR,) | 1.57 | 3.19 | 1.02 |
| <i>Nptx2</i> | Pentraxina Neuronal 2 | 1.46 | 6.22 | -1.10 |
| <i>Nr4a1</i> | Receptor Nuclear de la subfamilia 4, grupo A, miembro 1 | 1.32 | 9.59 | 1.10 |
| <i>Ntrk2</i> | Receptor Neurotrófico de tirosina kinasa, tipo 2 | 1.28 | 2.02 | 1.51 |
| <i>Pick1</i> | Proteína de interacción con PRKCA 1 | 3.02 | 1.06 | 1.56 |
| <i>Pim1</i> | Oncogén Pim-1 | 4.96 | 1.27 | 1.82 |
| <i>Plat</i> | Activador Tisular del Plasminógeno | 2.77 | 1.35 | 1.27 |
| <i>Plcg1</i> | Fosfolipasa C, gamma 1 | 2.67 | 3.28 | 1.87 |
| <i>Ppp1ca</i> | Proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isoforma alfa | 2.36 | 3.46 | 1.96 |
| <i>Ppp1cc</i> | Proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isoforma gamma | 2.13 | 25.18 | 1.12 |
| <i>Ppp1r14a</i> | Subunidad reguladora (inhibitoria) 14A de la Proteína fosfatasa 1, | 3.18 | 1.03 | -1.08 |
| <i>Ppp2ca</i> | Proteína fosfatasa 2, subunidad catalítica, isoforma alfa | 2.16 | -1.04 | 1.01 |
| <i>Ppp3ca</i> | Proteína fosfatasa 3, subunidad catalítica, isoforma alfa | 1.84 | 2.98 | 1.55 |
| <i>Prkca</i> | Proteína kinasa C, alfa | 1.19 | -1.06 | 1.45 |
| <i>Prkg1</i> | Proteína kinasa, dependiente de cGMP, tipo 1 | 1.09 | -1.22 | 1.76 |
| <i>Rab3a</i> | RAB3A, miembro de la familia de oncogenes RAS | 1.50 | -1.11 | 1.82 |
| <i>Rela</i> | V-rel Homóloga A del oncogén viral de la reticuloendoteliosis viral (aviar) | 1.58 | 1.33 | 2.70 |

| | | | | |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|------|
| <i>Reln</i> | Relina | 1.08 | -1.19 | 1.36 |
| <i>Rgs2</i> | Regulador de Proteínas G 2 | 1.41 | 1.31 | 1.10 |
| <i>Rheb</i> | Homólogo de Ras enriquecido en el cerebro | 1.36 | -1.81 | 1.76 |
| <i>Sirt1</i> | Sirtuina 1 (<i>silent mating type information regulation 2 homolog</i>) (<i>S. cerevisiae</i>) | 1.01 | -2.58 | 3.06 |
| <i>Srf</i> | Factor de respuesta al suero (Factor de transcripción de unión a elementos c-fos de respuesta al suero) | 1.33 | -1.14 | 2.52 |
| <i>Synpo</i> | Sinaptopodina | -1.18 | 1.58 | 2.18 |
| <i>Timp1</i> | TIMP inhibidor 1 de la metalopeptidasa | -1.04 | 3.20 | 2.20 |
| <i>Tnf</i> | Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2) | -1.10 | -3.91 | 1.88 |
| <i>Ywhaq</i> | Proteína theta de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa | -1.14 | 1.01 | 1.93 |

| | C | E | T |
|-----------------|---|---|---|
| <i>Cnr1</i> | | | |
| <i>Grip1</i> | | | |
| <i>Creb1</i> | | | |
| <i>Gria2</i> | | | |
| <i>Grm3</i> | | | |
| <i>Plcg1</i> | | | |
| <i>Ppp1ca</i> | | | |
| <i>Ppp1cc</i> | | | |
| <i>Fos</i> | | | |
| <i>Adcy8</i> | | | |
| <i>Akt1</i> | | | |
| <i>Arc</i> | | | |
| <i>Crem</i> | | | |
| <i>Egr1</i> | | | |
| <i>Egr2</i> | | | |
| <i>Ephb2</i> | | | |
| <i>Grm4</i> | | | |
| <i>Jun</i> | | | |
| <i>Junb</i> | | | |
| <i>Klf10</i> | | | |
| <i>Timp1</i> | | | |
| <i>Sirt1</i> | | | |
| <i>Adam10</i> | | | |
| <i>Ncam1</i> | | | |
| <i>Pick1</i> | | | |
| <i>Pim1</i> | | | |
| <i>Plat</i> | | | |
| <i>Ppp1r14a</i> | | | |
| <i>Ppp2ca</i> | | | |
| <i>Bdnf</i> | | | |
| <i>Camk2a</i> | | | |
| <i>Camk2g</i> | | | |
| <i>Dlg4</i> | | | |
| <i>Egr3</i> | | | |
| <i>Gnai1</i> | | | |
| <i>Gria1</i> | | | |
| <i>Gria3</i> | | | |
| <i>Gria4</i> | | | |
| <i>Grin1</i> | | | |
| <i>Grin2b</i> | | | |
| <i>Grm7</i> | | | |
| <i>Grm8</i> | | | |
| <i>Homer1</i> | | | |
| <i>Igf1</i> | | | |
| <i>Mapk1</i> | | | |
| <i>Ngfr</i> | | | |
| <i>Nptx2</i> | | | |
| <i>Nr4a1</i> | | | |
| <i>Ntrk2</i> | | | |
| <i>Ppp3ca</i> | | | |
| <i>Tnf</i> | | | |
| <i>Adcy1</i> | | | |
| <i>Cebpd</i> | | | |
| <i>Rela</i> | | | |
| <i>Srf</i> | | | |
| <i>Synpo</i> | | | |
| <i>Cdh2</i> | | | |
| <i>Gabra5</i> | | | |
| <i>Nfkb1</i> | | | |
| <i>Prkca</i> | | | |
| <i>Prkg1</i> | | | |
| <i>Rab3a</i> | | | |
| <i>Reln</i> | | | |
| <i>Rgs2</i> | | | |
| <i>Rheb</i> | | | |
| <i>Ywhaq</i> | | | |

Figura 20: Lista de genes ordenados en función de la existencia o ausencia de una diferencia de ≥ 2 en el ratio de expresión entre el lado izquierdo y el derecho en el TG. Los genes con aumento de expresión se ven en magenta y los genes con disminución de la expresión en azul. C=Controles; E=Enriquecidos; T=Trimming.

Expresión de mRNA de genes relacionados con la transmisión glutamatérgica en el ganglio del trigémino

De los 66 genes analizados, 15 codifican para proteínas directamente implicadas en la transmisión glutamatérgica siendo estos a los que vamos a dedicar una mayor atención en este estudio. Cuatro codifican para las subunidades 1-4 de los receptores AMPA (*Gria1-4*); otros dos para las subunidades 1 y 2b (*Grin1*, *Grin2b*) del receptor de NMDA; y otros cuatro para cuatro de los subtipos más importantes de receptores metabotrópicos, mGLUR3, 4, 7, 8 (*Grm3*, *Grm4*, *Grm7*, *Grm8*). Además, se seleccionaron otros 5 genes por su asociación con la neurotransmisión glutamatérgica (*Dlg4*, *Grip1*, *Homer1*, *Nptx2* y *Pick1*), en cuanto estaban implicados en fenómenos de agrupación, anclaje, eliminación y/o reciclaje de las subunidades de los receptores de glutamato de la membrana celular. Todos estos genes mostraron una diferencia de al menos 2 veces su ratio de expresión entre lados en uno o más grupos experimentales.

Asimetrías en Controles

Dos genes, uno codificante para una subunidad del receptor AMPA (*Gria2*) y el otro para otra del receptor metabotrópico (*Grm3*) mostraron mayor expresión en el lado izquierdo del TG. Otras proteínas asociadas a estos receptores, GRIP1 y PICK1 también tuvieron una mayor expresión en el lado izquierdo que el derecho en los TG de los controles (**Tabla 2**).

Tabla 3: Lista de genes relacionados con la transmisión glutamatérgica estudiados en el *microarray*. Las cuatro columnas muestran las diferencias de expresión para cada lado entre grupos, tomando como referencia el grupo control. Los valores en rojo y azul ponen de manifiesto diferencias de ≥ 2 en positivo o en negativo en el ratio de expresión, respectivamente.

| Símbolo | Ratio de expresión | | | |
|---------------|--------------------|-------|-------|-------|
| | ER/CR | EL/CL | TR/CR | TL/CL |
| <i>Dlg4</i> | -1,95 | 2,05 | 3,38 | 1,32 |
| <i>Gria1</i> | -1,67 | 2,23 | 2,66 | 1,15 |
| <i>Gria2</i> | -1,18 | 1,17 | 3,13 | -2,41 |
| <i>Gria3</i> | 0,65 | 1,47 | 0,89 | 1,39 |
| <i>Gria4</i> | 0,98 | 1,32 | 2,92 | 2,63 |
| <i>Grin1</i> | -1,34 | 1,84 | 2,11 | 1,07 |
| <i>Grin2b</i> | -2,55 | 1,16 | 1,28 | -2,96 |
| <i>Grip1</i> | -1,43 | 1,14 | 2,40 | -1,09 |
| <i>Grm3</i> | -2,44 | 1,11 | 4,29 | 1,22 |
| <i>Grm4</i> | -1,71 | 1,18 | 2,32 | 1,20 |
| <i>Grm7</i> | -2,91 | 1,49 | 1,46 | -1,44 |
| <i>Grm8</i> | -2,43 | 1,16 | 1,13 | -2,02 |
| <i>Homer1</i> | -1,82 | 1,04 | 1,83 | -2,05 |
| <i>Nptx2</i> | -2,30 | 1,85 | 6,08 | 3,78 |
| <i>Pick1</i> | 2,83 | 1,25 | 2,73 | -1,77 |

Cambios resultantes del recorte crónico de vibrisas en el lado derecho

Visto en conjunto, las asimetrías en la expresión de genes halladas en los controles desaparecen tras el recorte de vibrisas realizado en el lado derecho del morro y repetido en el tiempo, con la única excepción de *Grip1*. Así mismo, un gen que no mostraba diferencia de expresión entre lados en los controles (*Grm4*) aumenta su expresión en el TG izquierdo después del trimming (**Tabla 2**).

La mayoría de estos cambios con respecto a los controles son el resultado de una sobreexpresión generalizada en el TG derecho, es decir, el lado donde tiene lugar la privación del tacto háptico, combinado con una reducción menos patente de la expresión

en el ganglio izquierdo. La sobreexpresión en el lado derecho se produce en varios genes que codifican para subunidades de receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos, así como *Dlg4*, *Grip1*, *Nptx2* y *Pick1*. En el lado izquierdo, tres genes muestran un aumento de expresión, cada uno de ellos codificante para una subunidad de AMPA (*Gria2*), NMDA (*Grin2b*) y de receptores metabotrópicos (*Grm8*), junto con *Homer1* (**Tabla 3**).

Cambios asociados con la exposición a un ambiente enriquecido

A excepción de *Pick1*, los mismos genes que mostraron una expresión más elevada en el lado izquierdo del TG en los controles aparecen sobreexpresados también en el grupo E. Además de estos, aparece un aumento de expresión en el lado izquierdo de otros 9 genes más (*Dlg4*, *Gria1*, *Gria3*, *Gria4*, *Grin2b*, *Grm4*, *Grm7*, *Grm8*, and *Nptx2*) que codifican para varias subunidades de receptores de glutamato, PSD95, y una pentraxina neuronal (**Tabla 2**) tras dos meses de enriquecimiento.

Las comparaciones de lado entre el grupo E y el grupo C revelaron una tendencia general a una disminución en la expresión en el TG derecho y pocos cambios en el izquierdo, lo que sugiere que las numerosas asimetrías encontradas tras el enriquecimiento se deben en su mayoría a un descenso de la expresión en el lado derecho, más que a un aumento en el TG izquierdo. Hay tres genes que se separan de esta tendencia, *Pick1*, que se encuentra sobreexpresado en el ganglio derecho, y *Dlg4* y *Gria1*, que se encuentran sobreexpresados en el ganglio izquierdo (**Tabla 3**).

Cambios en los niveles de proteínas relacionados con la plasticidad glutamatérgica

Para evaluar una posible correlación entre los cambios en los niveles de mRNA con cambios a nivel proteico, se seleccionaron seis genes de receptores de glutamato, cuatro ionotrópicos y dos metabotrópicos, y un gen de una proteína de andamiaje, relacionada con el tráfico de los receptores AMPA, que mostraban diferencias de expresión génica tras manipulación de la entrada sensorial y se analizaron sus niveles proteicos. En general, los niveles de los receptores ionotrópicos estudiados (GLUR1, GLUR2, GLUR4 y NMDA2B) fueron más elevados en el ganglio izquierdo que en el derecho en los animales control y en los enriquecidos (**Fig. 21**). El análisis estadístico de los datos, sin embargo, no fue significativo en ninguno de los casos y sólo en algunos se acercó a una tendencia (test T de Student pareada de dos colas; Grupo E: GLUR4, $p=0,085$; Grupo E: NMDAR2B, $p=0,087$). Por el contrario, los niveles de NMDA2B ($p=0,003$) fueron más bajos en el ganglio izquierdo en los animales del grupo T (**Fig. 21**).

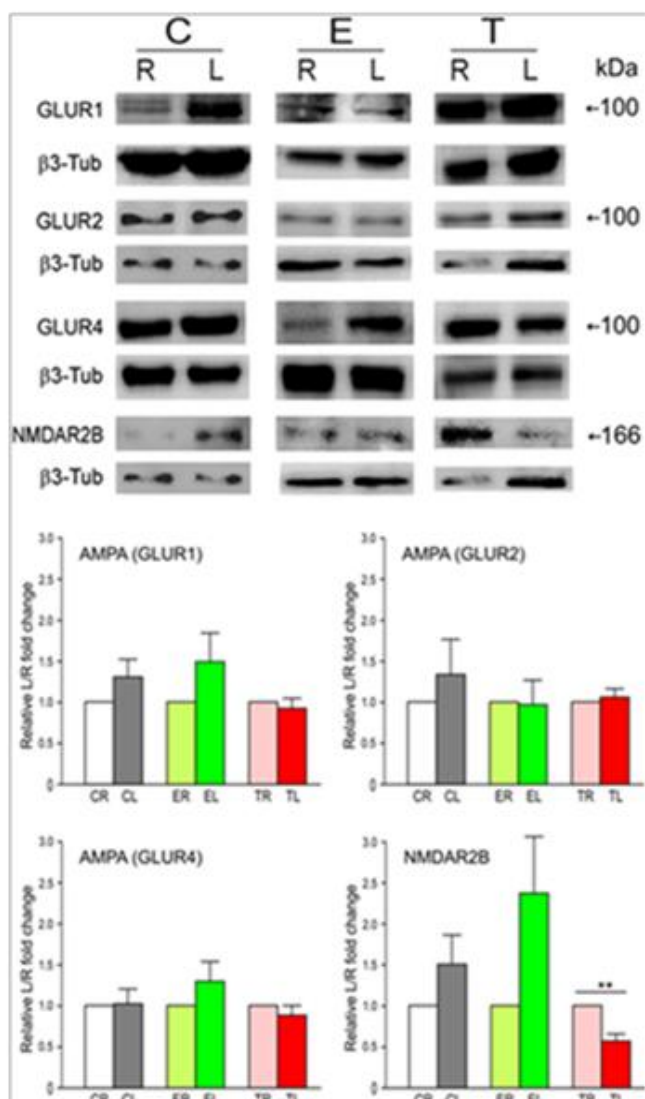


Figura 21: Diferencia en los niveles de proteínas entre lados en el TG. **Parte superior:** Western blots representativos de los receptores ionotrópicos analizados en el lado izquierdo (L) y en el lado derecho (R) del TG en el mismo animal de los grupos Control, Enriquecido y Trimming. La β 3-tubulina se usó como control de carga. **Parte inferior:** Diferencias entre el lado izquierdo y derecho en los niveles proteicos de GLUR1, GLUR2, GLUR4 y NMDAR2B. Las variaciones en los niveles de expresión proteicos se expresaron tomando el lado derecho como el 100%. Las barras de error representan la SEM. **p < 0,01 comparaciones entre lados del mismo grupo; test T de Student pareado de dos colas.

En cuanto a los receptores metabotrópicos, en general los niveles proteicos fueron más elevados en el lado izquierdo que en el lado derecho en los tres grupos, Controles, Enriquecidos y Trimming. El análisis estadístico de los datos se acercó a una tendencia en alguno de estos casos (test T de Student pareada de dos colas; Grupo C: mGLUR3, p=0,072; Grupo C: mGLUR8, p=0,055) y sólo fue significativo en el grupo E en el caso de mGLUR8 (test T de Student pareada de dos colas; p=0,043) (**Fig. 22**).

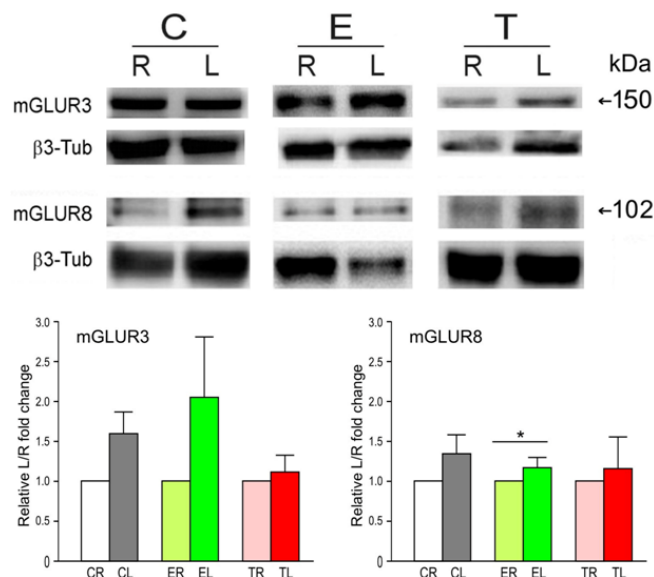


Figura 22: Diferencia en los niveles de proteínas entre lados en el TG. **Parte superior:** Western blots representativos de los receptores metabotrópicos analizados en el lado izquierdo (L) y en el lado derecho (R) del TG en el mismo animal de los grupos Control, Enriquecido y Trimming. La β 3-tubulina se usó como control de carga. **Parte inferior:** Diferencias entre el lado izquierdo y derecho en los niveles proteicos de mGLUR3 y mGLUR8. Las variaciones en los niveles de expresión proteicos se expresaron tomando el lado derecho como el 100%. Las barras de error representan la SEM. * $p < 0,05$ comparaciones entre lados del mismo grupo; test T de Student pareado de dos colas.

Los niveles proteicos de PICK1, una proteína de andamiaje relacionada con el tráfico de receptores AMPA, también fueron más elevados en el ganglio trigémino izquierdo en los tres grupos experimentales, aunque tras realizar el análisis estadístico esta diferencia sólo fue significativa en el caso del grupo de animales E (test T de Student pareada de dos colas; $p=0,022$) (**Fig.23**).

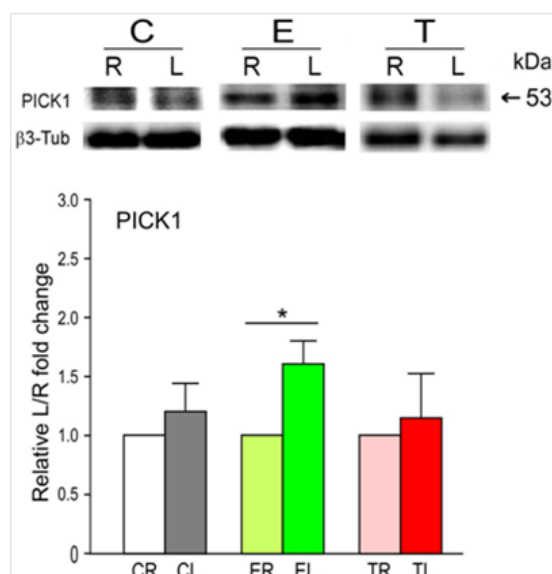


Figura 23: Diferencia en los niveles de proteínas entre lados en el TG. **Parte superior:** Western blots representativos de la proteína PICK1 analizada en el lado izquierdo (L) y en el lado derecho (R) del TG en el mismo animal de los grupos Control, Enriquecido y Trimming. La β 3-tubulina se usó como control de carga. **Parte inferior:** Diferencias entre el lado izquierdo y derecho en los niveles proteicos de PICK1. Las variaciones en los niveles de expresión proteicos se expresaron tomando el lado derecho como el 100%. Las barras de error representan la SEM. * $p < 0,05$; comparaciones entre lados del mismo grupo; test T de Student pareado de dos colas.

Las comparaciones de lados entre grupos mostraron una tendencia al aumento de los niveles de dos de los cuatro receptores ionotrópicos estudiados (GLUR2 y NMDA2B) en el ganglio izquierdo en el grupo E comparado con el grupo C. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para NMDAR2B (test T de Student no pareado de dos colas para comparaciones entre el mismo lado; $p=0,034$), sin embargo, el nivel de proteínas en los otros dos receptores ionotrópicos (GLUR1 y GLUR4) fue mayor en el lado izquierdo del grupo C que en el lado izquierdo del grupo E y estas diferencias fueron estadísticamente significativas en ambos casos (test T de Student no pareado de dos colas para comparaciones entre el mismo lado; GLUR1, $p=0,023$; GLUR4, $p=0,018$) (**Fig. 24**). El recorte continuado de las vibrisas, produjo un notable descenso de los niveles de GLUR2 en el ganglio izquierdo comparado con el grupo C (test T de Student no pareado de dos colas para comparaciones entre el mismo lado; GLUR2, $p=0,026$). Además en los receptores GLUR4 y NMDA2B también hubo diferencias de expresión proteica en el ganglio derecho. Los niveles de GLUR4 fueron significativamente más elevados en el ganglio derecho del grupo C que en el del grupo E pero menos elevados que en el ganglio derecho del grupo T, ambas diferencias fueron estadísticamente significativas (test T de

Student no pareado de dos colas para comparaciones entre el mismo lado; GLUR4, CRvsER $p < 0,001$; CRvsTR $p = 0,039$). En el caso de NMDA2B los niveles de expresión proteica en el ganglio del grupo C también fueron significativamente menores que en el grupo T (test T de Student no pareado de dos colas para comparaciones entre el mismo lado; NMDA2B, CRvsTR $p = 0,001$) (**Fig. 24**).

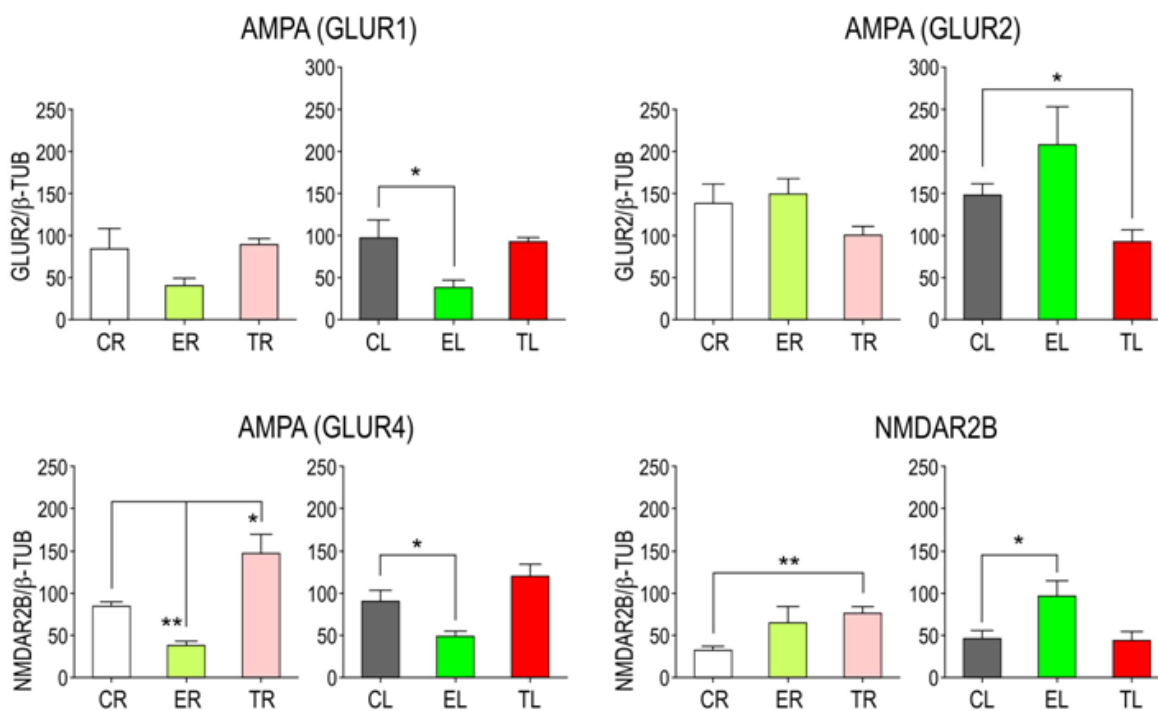


Figura 24: Comparaciones de lado entre grupos en los niveles de las proteínas GLUR1, GLUR2, GLUR4 y NMDAR2B en el TG. Las barras de error representan la SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Test T de Student no pareado con dos colas.

En las comparaciones entre grupos de los dos receptores metabotrópicos estudiados se observa que el receptor mGLUR8, no muestra cambios tras ninguna de las dos modificaciones de la entrada sensorial mientras que mGLUR3 muestra en el lado izquierdo un descenso significativo de sus niveles tras privación por recorte de vibras comparado con la situación control (test T de Student no pareado de dos colas para comparaciones entre el mismo lado; $p = 0,016$) (**Fig. 25**).

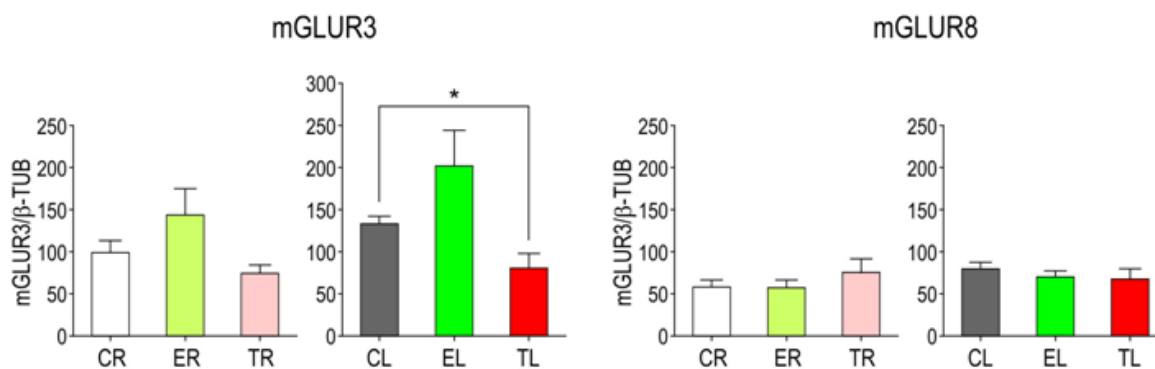


Figura 25: Comparaciones de lado entre grupos en los niveles de las proteínas mGLUR3 y mGLUR8 en el TG. Las barras de error representan la SEM. * $p < 0,05$; Test T de Student no pareado con dos colas.

La proteína PICK1 no mostró variaciones en sus niveles de expresión en el ganglio derecho tras manipulación de la entrada sensorial, sin embargo en el ganglio izquierdo su nivel de expresión fue más elevado tras enriquecimiento ambiental que en el grupo C, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (test T de Student no pareado de dos colas para comparaciones entre el mismo lado; $p=0,030$) (**Fig.26**).

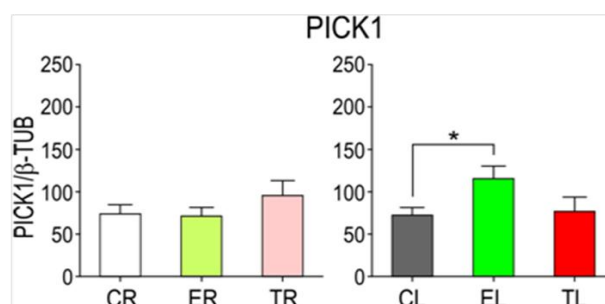


Figura 26: Comparaciones de lado entre grupos en los niveles de la proteínas PICK1 en el TG. Las barras de error representan la SEM. * $p < 0,05$; Test T de Student no pareado con dos colas.

DISCUSIÓN

Generalidades de resultados principales y del modelo elegido

En esta Tesis Doctoral hemos tratado de determinar los cambios morfológicos que se producen en las terminaciones centrales de los aferentes sensitivos primarios cuyos axones periféricos se localizan en un único DVN y que envían su terminación central a los núcleos del complejo sensitivo del tronco del encéfalo tras modificar su entrada de información sensorial. Además, hemos hecho una primera aproximación para elucidar cuales son los mecanismos moleculares subyacentes a estas modificaciones estudiando la expresión de distintos genes y proteínas asociados con la neurotransmisión glutamatérgica en el TG, lugar donde se localizan los somas de estas neuronas aferentes primarias, en ratas sometidas a los mismos tipos de manipulación de la entrada sensorial.

Los resultados de este trabajo revelan que las terminaciones centrales de los aferentes primarios cambian en respuesta a modificaciones prolongadas de la entrada sensorial y que estas modificaciones son más generalizadas en el caso del enriquecimiento ambiental que en el caso de la privación del tacto háptico por recorte de vibrisas. En particular hemos descubierto que las varicosidades que se marcan con CTB, presumiblemente de fibras mielínicas, aumentan en número y tamaño en la mayoría de los núcleos del complejo trigeminal sensitivo del tronco del encéfalo tras enriquecimiento ambiental. Sin embargo, tras privación por recorte de bigotes estos efectos se restringieron al Sp5c, en el que se encontró un notable aumento en el número y tamaño de estas varicosidades. Además, hemos sido capaces de desarrollar una técnica de trazado por inyección en el DVN que produce resultados consistentes con una tasa elevada de éxito. El patrón de terminación regional y laminar de las arborizaciones axónicas que hemos obtenido en este estudio, coincide con otros trabajos en los que los aferentes se identificaron de forma fisiológica y se marcaron a través de inyecciones intraaxonales de HRP o Neurobiotina (Hayashi, 1985; Jacquin et al., 1993; Shortland et al., 1995). Los pocos estudios de trazadores que existen en varios o en un único DVN, con los que podemos comparar nuestro trabajo, utilizaron HRP, como trazador que es menos sensible, y además se inyectó para marcar de manera más general a través de grandes inyecciones en el TG. Estos estudios describen la existencia de una distribución somatotópica de los aferentes primarios en Pr5, Sp5o, Sp5ip y las láminas profundas de Sp5c que coincide con nuestros hallazgos. Sin embargo estos estudios no incluyen ningún tipo de análisis cuantitativo y tampoco son capaces de detectar los aferentes que nosotros hemos observado en la lámina II de Sp5c (Hayashi, 1985; Jacquin et al., 1993; Shortland et al., 1995). Por

último, hemos observado que la distribución de las fibras del DVN que captan el trazador IB4, presumiblemente amielínicas, está restringida de forma exclusiva a las láminas I-II de Sp5c.

En cuanto a los cambios moleculares analizados en el TG, este es el primer estudio que sepamos hasta la fecha, en el que se han examinado, utilizando técnicas de *microarray* y WB, los cambios en expresión de una serie de genes y proteínas relacionados con la neurotransmisión glutamatérgica en el TG de ratas expuestas de forma crónica a un ambiente enriquecido, o a recorte unilateral de vibrisas y se hayan comparado con controles sin manipular. Uno de nuestros primeros resultados ha sido constatar que existen diferencias de lado en la expresión de algunos genes que codifican para unidades específicas de los receptores AMPA y metabotrópicos (GLUR2 y mGLUR3) y para proteínas implicadas en la agrupación y estabilización de receptores AMPA (GRIP1 y PICK1) en los animales control que no han sido sometidos a ningún tipo de manipulación. La presencia de asimetrías en el cerebro de los roedores ya se había descrito con anterioridad, en cuanto al comportamiento de búsqueda de comida por ejemplo (LaMendola y Bever, 1997). Además en nuestro grupo ya habíamos descrito su existencia en trabajos previos tanto en algunos tipos de neuronas del TG como en las dendritas de las neuronas barrilete de Pr5 y de forma más sutil en las neuronas intersubnucleares de Sp5c (Lagares y Avendaño, 2000; Martin et al., 2014; Negredo et al., 2009). En segundo lugar hemos comprobado que tras manipulación unilateral de la entrada sensorial se producen cambios en la expresión de genes y proteínas en las neuronas primarias de los TGs de ambos lados, hechos que habíamos puesto de manifiesto anteriormente en nuestro grupo y que suceden en neuronas de segundo orden en los núcleos trigeminales del tronco del encéfalo (Martin et al., 2014; Negredo et al., 2009). Por último hemos descubierto que las modificaciones tanto negativas como positivas de la entrada sensorial, son capaces de regular de forma diferencial la expresión de algunos genes y proteínas relacionadas con la neurotransmisión glutamatérgica.

A continuación, tras comentar las limitaciones metodológicas de los métodos utilizados en la realización de este trabajo, aportaré argumentos para resaltar la relevancia que tienen los aferentes primarios y sus terminaciones centrales en el procesamiento somatosensorial y la implicación que tienen sus cambios morfológicos y moleculares en la plasticidad dependiente de entrada sensorial al ser ellos los que realizan la primera transducción de la información sensorial y los que envían esta información a centros superiores pudiendo tener una notable influencia sobre ellos.

Limitaciones metodológicas

Animales de experimentación

Se sabe que existen diferencias en los cambios plásticos del cerebro al enriquecimiento dependientes del sexo del animal de experimentación que parecen estar relacionadas con los estrógenos (Diamond, 1988). Para evitar la posible influencia de las hormonas relacionadas con el ciclo estral en nuestro estudio se utilizaron ratas macho en todos los experimentos, tanto para el análisis de las terminaciones de los aferentes primarios como para el análisis molecular en el TG.

Los animales utilizados en este trabajo al inicio del experimento tenían unos 60 ± 5 días de edad, es decir animales postpuberales. Los tratamientos experimentales, tanto la exposición al enriquecimiento ambiental y el recorte de vibrisas, se llevaron a cabo durante 6 semanas por lo que los animales tenían alrededor de 4 meses cuando finalizaron los experimentos, es decir animales adultos jóvenes. Aunque los cambios plásticos son más evidentes en el cerebro de animales recién nacidos, se sabe que los animales adultos siguen siendo sensibles a las modificaciones de la entrada sensorial. En nuestro grupo nos hemos centrado en los últimos años en el estudio de las complejas variables que pueden intervenir en la plasticidad subcortical y periférica en animales adultos jóvenes, y hemos demostrado que estos animales son capaces de experimentar cambios plásticos tanto en la corteza (Machín et al., 2006) como en las neuronas secundarias de los núcleos del trigémino (Martin et al., 2014; Negredo et al., 2009) por lo que hemos utilizado animales de la misma edad en el desarrollo de esta Tesis.

Inyección del trazador

Durante la cirugía ha sido casi imposible evitar que una pequeña parte de la solución con la mezcla de trazadores se derramase en los alrededores del DVN, a pesar de la precaución a la hora de aislar el nervio y de limpiar el área con cuidado para que el nervio no se estirase y no sufriese ningún daño. De hecho, en todos los casos se marcaron de forma retrógrada con CTB un número variable de motoneuronas del núcleo facial. Esto puede deberse a que el trazador haya sido captado por los músculos de las vibrisas y/o por posibles daños a terminaciones del nervio facial. Sin embargo esta supuesta limitación jugó en nuestro favor y nos permitió asegurarnos de que la inyección no producía un marcado falso en Sp5c. Como precaución a la hora de realizar la cirugía es importante no dañar los DVNs de las vibrisas circundantes, ni dejar que el trazador difunda a los nervios superficiales de las vibrisas.

Aunque la punta de la pipeta de vidrio utilizada en las inyecciones es pequeña, incluso comparada con el pequeño diámetro del nervio, no se puede excluir que algunos axones se dañen al inyectar. Este daño podría ser responsable de la débil innervación de axones marcados con CTB que se detecta en la lámina II, ya que esta pequeña lesión tras la inyección podría inducir un cierto grado de reorganización en las terminaciones centrales durante los 4 días de supervivencia. Sin embargo, no hemos encontrado ningún trabajo sobre lesiones nerviosas periféricas que apoye estos hechos. El grupo de Woolf (1995), demostró, inyectando B-HRP en el nervio ciático de animales controles o a los que se les había realizado una ligadura, que seis días después de ligar el nervio ciático el patrón laminar del marcado en el asta dorsal era idéntico entre animales con ligadura y animales control (tras 3 días de supervivencia), con un marcado intenso en las láminas I, III-VII y la falta total de marcado en la lámina II. Diez días después de la ligadura, sin embargo se observó una expansión parcial de fibras marcadas hacia la lámina II, y para el día 17 después de la ligadura la invasión de fibras en la lámina II fue completa. El grupo de Bao (2002) obtuvo resultados similares usando inyecciones de CTB en el nervio ciático después de axotomía, observando un transporte de CTB evidente en la lámina II 10 días después de la lesión pero no 5 días después. Por lo tanto, aún teniendo en cuenta que existen diferencias de captación entre B-HRP y CTB, parece poco probable que el daño infligido por nuestra inyección al DVN pueda ser responsable de la reorganización de las terminaciones centrales.

Otro hecho importante fue el de asegurarnos que las inyecciones eran consistentes entre animales y que las diferencias morfométricas encontradas en sus terminales se debían a las condiciones experimentales y no a posibles diferencia en el número de fibras marcadas. Para ello, comenzamos recogiendo muestras del DVN, en zonas proximales al sitio de la inyección, y del TG de los mismo animales que después utilizamos para los estudios morfométricos. El marcado hallado en estas estructuras fue muy débil, probablemente debido a que el tiempo de supervivencia tras la inyección fue relativamente largo y a la pequeña cantidad de trazador que podía ser inyectado debido al minúsculo tamaño del DVN. Por lo tanto, probamos con tiempos más cortos de supervivencia (24 horas), el marcado con inmunofluorescencia en estos animales mostró que aparentemente todos los axones del DVN presumiblemente mielínicos estaban marcados con CTB, y que numerosas células del TG mostraban inmunofluorescencia para CTB, IB4 o mixta en algunos casos. Más adelante, para confirmar que el marcado del nervio era completo realizamos un inmunomarcado para CTB e IB4 en secciones del DVN antes de incluir el nervio en resina para observarlo en cortes semifinos y ultrafinos en el microscopio electrónico. Este caso nos permitió confirmar que aparentemente todos los axones, tanto mielínicos como amielínicos, mostraban la presencia del trazador en su axoplasma.

Además, también cuantificamos estereológicamente el número de neuronas marcadas con CTB e IB4 en un TG cortado de forma seriada, y el número de neuronas marcadas en el ganglio coincidió con el número de axones en el nervio (aproximadamente 290), y esos valores estaban en consonancia con los valores medios publicado en otros estudios (Crissman et al., 1991).

Elección de CTB e IB4

Se ha descrito que el uso simultáneo de dos o más trazadores puede comprometer el éxito del marcado transganglionar de las proyecciones centrales. Por ejemplo, Liu y colaboradores (Liu et al., 1995), combinando inyecciones de CTB con HRP y WGA con HRP en el nervio ciático, sólo encontraron unas pocas células marcadas en los DRGs y no observaron ningún tipo de marcado en la médula espinal. Sin embargo, parece que este tipo de interferencia no sucede cuando CTB se combina con otros trazadores. Shehab y Hughes (Shehab y Hughes, 2011) inyectaron en el nervio ciático CTB e IB4 o CTB y WGA, y observaron un fuerte marcado revelado por inmunofluorescencia en la médula espinal y en las neuronas de los DRGs con ambas combinaciones de trazadores. Además vieron que las fibras mielínicas eran positivas para CTB, mientras que las fibras amielínicas lo eran para IB4 y WGA.

Identificación y recuento de varicosidades

En los estudios cuantitativos de varicosidades axónicas con microscopía óptica no se puede evitar un cierto grado de subestimación, ya que las dilataciones pequeñas de los axones más finos están por debajo de la resolución del microscopio óptico convencional (unos 150 nm). Además, algunas varicosidades se pueden pasar por alto en zonas donde el marcado es muy intenso y se pueden confundir con axones alineados en la dirección de foco. Para evitar, o al menos minimizar el sesgo, se establecieron varios criterios para identificar de forma cualitativa a las varicosidades y clasificarlas en las dos clases, *d* o *q*, antes de la cuantificación; tras este paso se estimó el área de la sección transversal de las varicosidades muestreadas de forma adecuada, y finalmente se estableció un tamaño de sección mínimo de $0.20 \mu\text{m}^2$, por debajo del cual sólo se encontraron de forma ocasional algunas varicosidades pertenecientes a la clase *q*. Esta forma de proceder, además de generar una población de varicosidades más homogénea y comparable, fue capaz de atenuar el sesgo de las varicosidades pertenecientes a la clase *d* (más detalles en Métodos).

Limitaciones de las técnicas moleculares

Para realizar el análisis de expresión en el TG, se utilizó un kit comercial que fue el que nos pareció más idóneo para nuestros intereses en cuanto al contenido de genes implicados con la plasticidad, a su reproducibilidad, a su especificidad y su coste. Además de los 84 genes implicados en la plasticidad sináptica, el microarray incluía: 5 genes de expresión constitutiva (*housekeeping genes*) que permitieron la posterior normalización de los datos; el control para DNA genómico, que permitió detectar la posible contaminación en la muestra; los controles de la retrotranscripción, 3 RNAs que sirvieron de control interno y tres controles positivos para la PCR que testaron la eficiencia de la reacción de PCR. Además, para reducir la posible variabilidad biológica (Kendziorski et al., 2005) se utilizó el mRNA de un pool de 4 ganglios por cada lado y cada grupo experimental, de forma que no fue necesario repetir más de una vez cada *microarray*.

En cuanto a las técnicas de WB, en nuestro caso al utilizar el TG al completo podría existir un “efecto de dilución” en los niveles de las proteínas que se quieren detectar debido a que no hemos aislado la parte del ganglio correspondiente a la rama infraorbitaria y a que no todas las células de ese tejido expresen la proteína de interés y también al hecho de que el resultado obtenido tras la densitometría de la banda de interés se relativiza en función de la cantidad total de proteínas. A esto se le añade el problema de que en ocasiones los anticuerpos comerciales utilizados no producen una única banda y esto dificulta su posterior cuantificación.

Localización celular de las moléculas diana

Una gran variedad de técnicas moleculares han demostrado concluyentemente que los somas de las células en los DRGs y el TG son responsables de la expresión de buena parte de los genes y proteínas implicadas en la neurotransmisión glutamatérgica. Pero hay tres factores que complican esta visión considerablemente simplificada. Primero, muchas de las proteínas relacionadas con el glutamato se encuentran con mayor frecuencia en los terminales axónicos, en lugar de en los cuerpos celulares, y por tanto al encontrarse fuera del ganglio no se han tenido en cuenta en nuestro análisis. Segundo, las SGCs, que recubren los cuerpos neuronales y regulan numerosos aspectos del microambiente, incluyendo el tráfico de neurotransmisores (Hanani, 2005), responden con aumentos en el Ca^{2+} intracelular al AMPA, NMDA, kainato, y a los agonistas metabotrópicos y expresan GLUR4, NMDAR1, NR2B y NR3A, mGLUR1, mGLUR5 y mGLUR8 (Boye Larsen et al., 2014; Castillo et al., 2013; Ferrari et al., 2014; Kung et al., 2013; Tachibana et al., 1994) y hasta la fecha se desconoce si otras de las células presentes en los DRGs y el TG expresan estas moléculas. Y tercero, la relación entre la transcripción y la traducción

siempre es compleja, y más cuando las prolongaciones de las células diana se extienden más allá del tejido analizado. La presencia de receptores de glutamato en el soma de las neuronas de los DRGs y del TG se ha establecido de forma clara, y se sabe que los receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos presinápticos de los aferentes primarios de la médula espinal se sintetizan en sus cuerpos neuronales, y se transportan en su mayoría centralmente a través de las raíces dorsales, como se ha demostrado tras experimentos de ligadura en estas raíces o tras rizotomía (Araki et al., 1993; Boye Larsen et al., 2014; Carlton et al., 2001; Lu et al., 2002; Sato et al., 1993). Además, datos recientes sugieren la presencia de receptores metabotrópicos en los terminales periféricos de las neuronas sensoriales primarias que hacen contacto con receptores periféricos (Watson, 2015). A lo que se suma, que es bastante probable que no sólo las proteínas, sino también los mRNA salgan del núcleo y se transporten a lo largo del axón hacia los terminales, donde se puede traducir a proteínas bajo demanda (Alvarez et al., 2000; Crispino et al., 2014). Las proteínas presinápticas e incluso algunos de los mRNAs en los terminales axónicos pueden llegar, al menos en parte, de transferencia directa desde células de glia vecina (Giuditta et al., 2002). Por lo tanto debemos tomar con precaución todas las interpretaciones preliminares realizadas para explicar los cambios de expresión observados en estudios a largo plazo.

Asimetrías de lado en la expresión de genes y en los niveles de proteínas

La existencia de asimetrías en el cerebro de los roedores se ha ignorado frecuentemente, o se ha estimado de poca importancia comparado con las bases neurales de funciones que están claramente lateralizadas en el cerebro humano. Estas lateralizaciones, que están presentes en muchas especies y les conceden ventajas adaptativas a nivel individual y/o poblacional, parecen surgir de una interacción entre mecanismos genéticos, epigenéticos y de experiencia (Vallortigara y Rogers, 2005).

En la literatura, ya se habían descrito cambios bilaterales en ganglios sensitivos, en la médula espinal o en el complejo trigeminal tras alteraciones invasivas de la entrada sensorial por transección nerviosa, inflamación o constricción crónica (Dubový et al., 2013; Fukuoka et al., 2001; Koltzenburg et al., 1999; Martin y Avendaño, 2009; Samsam et al., 2001; von Banchet et al., 2000). En el sistema trigeminal, también se han descrito asimetrías entre lados y efectos bilaterales de manipulaciones unilaterales de la entrada sensorial en la corteza de barriles (Machín et al., 2004; Riddle y Purves, 1995). Además, en el sistema vibrisas-corteza de barriles en las ratas, existe un sesgo hacia el lado derecho a la hora de llevar a cabo ciertas conductas exploratorias, habiéndose visto que estos

animales aprenden de forma más eficiente tareas de búsqueda de alimento con los bigotes del lado derecho, y por lo tanto con la corteza de barriles izquierda (LaMendola y Bever, 1997). A nivel celular, se encontró una marcada asimetría en las neuronas *barrilete*, que son las principales neuronas dentro de los núcleos sensitivos trigeminales del tronco del encéfalo que envían la información de las fibras mecanorreceptoras primarias hacia el tálamo somatosensorial. Estas neuronas poseen dendritas significativamente más largas en el lado izquierdo, y esta diferencia desaparece tras el recorte crónico de las vibrisas en el lado derecho, una manipulación que también produjo una serie de cambios bilaterales en las dendritas y las espinas (Negredo et al., 2009). Es más, Lagares y Avendaño (Lagares y Avendaño, 2000) encontraron que las neuronas sensitivas primarias de mayor tamaño, presumiblemente mecanorreceptoras, tenían en promedio somas más grandes, en concreto un 23% más grandes en el TG derecho que en el izquierdo. Además, se ha visto en humanos que los nervios sensitivos tienen velocidades de conducción distintas en el lado derecho e izquierdo, aunque se desconocen las posibles bases neurales de estas asimetrías (Gupta et al., 2008; Tan, 1993).

La participación de la neurotransmisión glutamatérgica en las asimetrías estructurales y funcionales no se había estudiado hasta ahora en niveles bajos de las vías sensoriales. Sin embargo, este sistema podría estar implicado en este tipo de mecanismos ya que se ha visto que en el hipocampo las sinapsis en las dendritas apicales de las células piramidales de CA1 tienen distinta composición en sus receptores de glutamato y distintas características morfológicas. Las sinapsis que se establecen con el CA3 izquierdo parecen ser más pequeñas y tiene mayores niveles de NMDAR2B postsinápticos, mientras que las espinas que contactan con terminales del CA3 derecho son mayores, más ricas en la subunidad GLUR2 del receptor AMPA y con menores niveles de NMDAR2B (Kawakami et al., 2003; Shinohara et al., 2008). Además esta diferencia tenía consecuencias funcionales siendo las sinapsis desde el CA3 izquierdo capaces de inducir una mayor LTP dependiente del tiempo de disparo que las del CA3 derecho (Kohl et al., 2011). En esta tesis no hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de proteínas de las subunidades de los receptores de glutamato entre lados en los animales control. Sin embargo, *Gria2*, el gen que codifica para GLUR2, mostró una mayor expresión en el TG izquierdo, y la misma diferencia se encontró también en *Grip1* y *Pick1*, que codifican para proteínas directamente implicadas en la internalización dependiente de actividad y en la estabilización intracelular de receptores con subunidades GLUR2, eventos que juegan un papel muy importante en la generación de plasticidad dependiente de actividad sensorial (Takamiya et al., 2008; Terashima et al., 2008).

Efectos de la privación del tacto háptico por recorte de vibrisas

En las terminaciones de los aferentes primarios

Los efectos del recorte de vibrisas en los niveles superiores del procesamiento somatosensorial se han investigado de forma extensa en particular, en la corteza de barriles. Cuando el recorte se realiza en los primeros días de vida postnatal o en animales jóvenes, se producen cambios duraderos en las sinapsis y dendritas corticales (Chen et al., 2015; Lee et al., 2009; Micheva y Beaulieu, 1995; Zuo et al., 2005), en el balance entre excitación e inhibición en el procesamiento sensitivo cortical (Shoykhet et al., 2005; Simons et al., 2015), y en algunos aspectos específicos del comportamiento sensitivo-motor exploratorio (Chu et al. 2013; Lee et al. 2009). Aunque de forma menos pronunciada, se siguen observando cambios anatómicos y funcionales cuando la privación se realiza en sujetos postpuberales y adultos. En concreto, en las zonas privadas, la actividad de los circuitos inhibitorios está atenuada, tanto en el tálamo (Dolan y Cahusac, 2007), como en las capas corticales medias y profundas, dónde esta disminución es más marcada (Fuchs y Salazar, 1998; Kätzel y Miesenböck, 2014; Maier et al., 2003). Es más, las neuronas corticales privadas por recorte de vibrisas parecen responder en menor medida al glutamato o a los agonistas glutamatérgicos (Dolan y Cahusac, 2007), y aunque no se producen cambios manifiestos en las sinapsis excitatorias o inhibitorias en las capas corticales medias, hay un incremento de sinapsis excitatorias putativas en las capas superficiales de la corteza de barriles afectada por la privación sensorial (Machín et al., 2006).

Excepto en contadas ocasiones, los efectos de la privación sensorial en los niveles precoces del procesamiento sensorial no se han estudiado en animales maduros. Las neuronas de segundo orden de las vías trigeminales muestran cambios morfométricos en sus dendritas tras manipulación crónica de la entrada sensorial (Martin et al., 2014; Negrodo et al., 2009), y más recientemente, hemos demostrado que algunos genes y proteínas relacionadas con la transmisión glutamatérgica cambian su expresión en el TG de ratas adultas tras una privación unilateral por recorte de bigotes (Fernández-Montoya et al., 2016). Los efectos de este último estudio fueron bilaterales, con un aumento sustancial de la expresión de genes que codifican para distintas subunidades de receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos en el ganglio privado, y un descenso en el TG contralateral. En un estudio reciente realizado en el sistema auditivo de ratas adultas jóvenes, se observaron cambios estructurales y moleculares en los terminales sinápticos del nervio auditivo en el núcleo coclear tras varios días de privación auditiva unilateral, obtenida taponando un oído (Clarkson et al., 2016). Se produjo un descenso en el número, densidad y tamaño de las

vesículas sinápticas, y en la expresión de un transportador vesicular de glutamato. Estos cambios se asociaron con un incremento duradero en la densidad postsináptica y con cambios en la composición de los receptores AMPA. Los autores sugieren que estos efectos pueden reflejar un mecanismo de compensación de las respuestas sinápticas para suplir la reducción en la entrada de información desde las fibras primarias.

Estos hallazgos pueden estar en consonancia con nuestros resultados. Usando el mismo protocolo de recorte de bigotes, hemos demostrado recientemente que las neuronas intersubnucleares privadas presentan una reducción significativa de sus espinas y de sus árboles dendríticos complejos, y un alargamiento moderado de algunos segmentos dendríticos (Martin et al., 2014). La desaparición del patrón normal de entrada sensorial puede haber inducido una expansión, en número y tamaño, de supuestas estructuras presinápticas, que finalmente se ha reflejado en cambios morfométricos de las dendritas postsinápticas de Sp5c. Sin embargo es curioso que este fenómeno no se haya encontrado en otros núcleos, como Pr5 y Sp5o, mientras que en Sp5ip las varicosidades han aumentado su tamaño pero no son más numerosas. No se sabe si las fibras aferentes que viajan en el DVN, que provienen de un tipo de receptor específico dentro del folículo y que son de un tipo específico, tienen una diana de preferencia o dianas separadas dentro del complejo sensorial trigeminal. Si ese tipo de segregación existiese, uno se podría plantear que la privación del tacto háptico afectase de forma diferencial a las distintas fibras del DVN, y por lo tanto produjese un patrón de cambios heterogéneo dentro del complejo. Aunque esta teoría es todavía especulativa, se puede apoyar en hallazgos previos que describen la existencia de características distintivas en las terminaciones de aferentes primarios de alto y bajo umbral que llegan a las láminas III-V de Sp5c (Jacquin et al., 1984; Miyoshi et al., 1994).

La mayoría de estudios sobre terminales en los núcleos del trigémino se han centrado en los aferentes primarios de los mecanorreceptores de bajo umbral, presumiblemente fibras grandes mielínicas, dejando sin explorar la población sustancial de fibras finas (incluyendo a las fibras amielínicas). Por lo tanto otra forma de interpretar estos cambios sería la siguiente: ya que las neuronas de Sp5c reciben más aferentes de diámetro fino que las neuronas de Pr5 y por lo tanto sus aferencias se verían menos afectadas por el recorte de vibrisas (que las de Pr5), se podría especular que la mayoría de los efectos de la privación en Sp5c se deban a cambios en las neuronas intersubnucleares de este mismo núcleo que sabemos que se producen tras la privación (Martin et al., 2014). Siendo capaces las estructura postsináptica de algún modo de influir sobre los terminales presinápticos e inducir su modificación.

En los receptores de glutamato del TG

Existe una gran cantidad de datos sobre los efectos moleculares, estructurales y funcionales que los distintos paradigmas de eliminación del tacto activo producen en la corteza somatosensorial (Cheetham et al., 2007; Feldman, 2009; Oberlaender et al., 2012). Sin embargo, los datos sobre las consecuencias a largo plazo de estas manipulaciones en las neuronas primarias que inervan los bigotes, o sus dianas en los núcleos trigeminales de tronco del encéfalo son muy escasos. Tras privación unilateral por recorte de vibrisas, las dendritas de las neuronas barrilete trigémino-talámicas en el Pr5 y la neuronas intersubnucleares del Sp5c sufren cambios bilaterales en la longitud y la distribución de sus espina dendríticas (Martin et al., 2014; Negredo et al., 2009). Estos cambios bilaterales también se encontraron en este estudio, y consistieron en una regulación al alza de la expresión de genes en el TG derecho junto con una moderada disminución en el lado izquierdo. Los genes implicados en estos cambios producidos por recorte de vibrisas codificaban para distintas subunidades de receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos, lo que sugiere que estos receptores juegan un papel activo en los cambios duraderos que se producen cuando se elimina la entrada de información procedente de los bigotes.

Los receptores AMPA, en particular los que tiene subunidades GLUR1, juegan un papel importante en el establecimiento de la LTD dependiente de la experiencia en las capas supragranulares de la corteza de barriles en ratones adultos, ya que si se elimina esta subunidad no se produce la depresión (Allen et al., 2003; Wright et al., 2008). La desaferentización permanente e irreversible de la corteza somática produce un aumento de los niveles de la subunidad GLUR1 en monos (Mowery et al., 2013, 2015). Por el contrario, las subunidades GLUR2 y GLUR3, que hacen que los receptores AMPA sean menos permeables al Ca^{2+} , y que están implicadas en la inserción y estabilización de estos receptores independientemente de la actividad, no presentaban modificaciones en la capa IV de la corteza de barriles varias semanas después del recorte de bigotes (Gierdalski et al., 1999) o tras la desaferentización permanente de la corteza somatosensorial en monos (Mowery et al., 2013, 2015). Nosotros hemos hallado que los genes que codifican para GLUR1 y GLUR2 (*Gria1* y *2*) están sobreexpresados en el TG derecho privado. La regulación al alza de *Gria1* y *Gria2* en el TG derecho no se traduce en aumentos en los niveles de sus proteínas GLUR1 y GLUR2, sin embargo tanto *Gria2* como GLUR2 se encuentran disminuidos en el TG izquierdo. GRIP1 es una proteína de andamiaje relacionada con las subunidades GLUR2/3 que se encarga de estabilizar en la membrana a los receptores AMPA postsinápticos que contienen estas subunidades. La disrupción de esta interacción es necesaria para que se produzca LTD (Kim et al., 2001). La cantidad total de GRIP1 y su distribución intracelular son dependientes de actividad: cuando la

neurona está activa la cantidad de GRIP1 se reduce, lo que produce la estabilización de los receptores AMPA en la membrana, mientras que en condiciones de actividad neuronal forzada, GRIP1 aumenta, y promueve la eliminación de los receptores AMPA de la sinapsis (Tan et al., 2015). Hay otra proteína de andamiaje, la proteína PICK1 que también se relaciona con los receptores AMPA. Se ha visto que PICK1 es fundamental en el tráfico de los receptores AMPA dependiente del Ca^{2+} y es esencial para la LTD mediada por receptores NMDA. PICK1 es capaz de retener a los receptores AMPA que han sido internalizados en las primeras fases de la LTD (Citri et al., 2010; Terashima et al., 2008). En los DRGs, tanto las neuronas primarias nociceptivas como las que no los son, expresan receptores AMPA presinápticos que contienen subunidades GLUR1 y GLUR2/3, y la mayoría de esos receptores se concentran en los terminales centrales de estas neuronas donde inhiben la liberación de glutamato (Lee et al., 2002). GRIP1 y PICK1 son más abundantes postsinápticamente, aunque también se han visto algunas isoformas de GRIP1 presinápticos en las sinapsis glutamatérgicas (Charych et al., 2006), del mismo modo PICK1 también está presente en las membranas presinápticas, incluyendo las zonas activas de las sinapsis y en la membrana de vesículas sinápticas que también contiene GLUR2 (Haglerod et al., 2009). Nosotros hemos observado que los cambios de expresión de *Grip1* y *Pick1* se asemejan a los del gen *Gria2* (que codifica para la subunidad GLUR2) mostrando asimetrías laterales en controles y una sobreexpresión en el TG privado.

Gria4, por el contrario, se encontró sobreexpresado de forma bilateral en el TG tras privación unilateral, aunque sus niveles proteicos (GLUR4) sólo aumentaron en el lado derecho tras privación. Hasta el momento, se ha descrito una sobreexpresión parecida de *Gria4* en el asta dorsal de la médula espinal después de 2-4 semanas de la transección del nervio ciático (Yang et al., 2004). Estos hechos, junto con el posible papel de los receptores AMPA con subunidades GLUR4 en la modulación de la nocicepción (Willcockson y Valtschanoff, 2008), apoyan la implicación de esta subunidad en los procesos de plasticidad dependiente de la entrada sensorial. Además, hace poco tiempo, que se ha descrito la presencia de *Nptx2*, un IEG que codifica para la proteína NPTX2, que es secretada por los terminales presinápticos y que induce la agrupación de receptores que contienen la subunidad GLUR4, en neuronas de tamaño pequeño-mediano en el DRG que podrían ser nociceptivas, así como en sus terminales en las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal (Miskimon et al., 2014), y estas mismas neuronas primarias también expresan GLUR4 (Lu et al., 2002). Ya que en nuestros resultados hemos visto que tanto *Nptx2* como *Gria4* estaban regulados al alza tras recorte de vibrisas unilateral, se puede especular que la reducción de la entrada de información sostenida en el lado privado (quizá combinado con la demanda de aumentar la información háptica contralateralmente) son factores implicados en la sobreexpresión de estos genes. Esta interpretación, de todas

formas, ha de tomarse con precaución, ya que NPTX2 también está implicado en la inflamación neural ya que es capaz de regular la reacción de los macrófagos/microglía a varios tipos de daños periféricos que inducen dolor (Miskimon et al., 2014), y en los DRGs GLUR4 también está presente en las células de la glía satélite (Tachibana et al. 1994).

Se ha visto que las subunidades NR1 y NR2B del receptor de NMDA sólo exhiben cambios transitorios en la corteza de sujetos adultos sometidos a privación prolongada de la entrada sensorial (Corson et al., 2009; He et al., 2004). Sin embargo, la ausencia de NMDAR1 conduce a un crecimiento excesivo de los aferentes trigeminales primarios en el tronco del encéfalo que no son capaces de seguir el patrón de organización espacial de los *barriletes* en el Pr5 (Lee, 2005). En el TG, la subunidad NMDA2B aumenta de forma significativa su nivel en el lado sometido a la privación crónica, aunque este aumento no sucede de forma paralela a su gen codificante *Grin2b*. No tenemos datos sobre los niveles proteicos de NMDAR1, pero su gen codificante (*Grin1*) también presenta una mayor expresión en el lado privado. La subunidad NR1 se expresa de manera preferente en las neuronas de tamaño grande, neuronas mecanorreceptoras primarias, y la subunidad N2B en los aferentes primarios pequeños, mientras que ambas subunidades se han detectado en las células de la glía satélite (Castillo et al., 2013). Por tanto, podría suceder que todos los tipos de células implicadas en la neurotransmisión glutamatérgica dentro del TG pudiesen exhibir adaptaciones duraderas en sus receptores NMDA tras privación de la información sensorial.

Se ha propuesto que la activación de las subunidades metabotrópicas mGLUR2/3 reduce la transmisión nociceptiva en los aferentes trigeminales (Boye Larsen et al., 2014). Nosotros hemos observado que *Grm3*, el gen que codifica para la subunidad mGLUR3, muestra una expresión basal mayor en el TG izquierdo, una diferencia que se ve aumentada tras enriquecimiento, debido principalmente a una reducción de su expresión en el lado derecho. Tras el recorte de bigotes, la expresión de *Grm3* aumentó en el lado privado, sin que se produjese aumento en sus niveles proteicos (mGLUR3), mientras que los niveles de proteína se vieron reducidos de forma significativa en el lado contralateral. Se podría especular que las neuronas sensitivas primarias aumentan el control que ejercen los receptores metabotrópicos en la modulación de la transmisión excitatoria en el lado privado, mientras que en las neuronas del lado intacto se reduce la expresión de estos receptores para de forma putativa favorecer la transmisión dependiente de la entrada sensorial.

Con respecto a otros receptores metabotrópicos, en nuestro estudio los genes que codifican para mGLUR7 y mGLUR8 no muestran cambios (*Grm7*) o sólo un moderado descenso en el lado izquierdo (*Grm8*). mGLUR7 se expresa tanto en neuronas pequeñas peptidérgicas en el DRG, y tanto la proteína como su mRNA se encuentran regulados a la

baja tras ligadura del nervio ciático (Li et al., 2012). mGLUR8 está presente tanto en las neuronas sensitivas primarias como en las células de la glía satélite, y presenta una elevada afinidad por el glutamato, lo que convierte a los receptores que tienen esta subunidad en un auto- y hetero-receptores muy sensibles que puede ser activados por liberación local de glutamato (Palazzo et al., 2014a). Ambas subunidades están relacionadas con la regulación de la neurotransmisión glutamatérgica y con la reducción de la nocicepción a nivel periférico (Govea et al., 2012; Palazzo et al., 2014b), lo que les convierte en buenos candidatos para estudios futuros sobre la plasticidad dependiente de entrada sensorial.

Efectos de la exposición al enriquecimiento ambiental

En las terminaciones de los aferentes primarios

Desde que Hebb propuso que ratas que vivían en ambientes más naturales, ricos desde el punto de vista sensitivo-motor, eran mejores aprendiendo a resolver laberintos que las que se vivían en jaulas de laboratorio estándar (Hebb, 1949), muchos estudios han puesto de manifiesto que ratas adultas expuestas a ambientes enriquecidos muestran cambios funcionales y estructurales en algunas regiones y algunos sistemas del cerebro. Gracias a su accesibilidad y a su relevancia en el comportamiento, el sistema trigeminal de los roedores ha sido el sistema de elección para este tipo de estudios. Animales sometidos a este tipo de ambientes muestran en la corteza somatosensorial aumentos en el grosor y el volumen cortical, en el número y longitud de sus dendritas, y en el número y/o tamaño de sus espinas, sinapsis, células gliales y capilares (Alwis y Rajan, 2014; Diamond, 1988; Faherty et al., 2003; Landers et al., 2011; Machín et al., 2004; Nithianantharajah et al., 2004; Rema et al., 2006; Walsh, 1981), así como un refinamiento de sus mapas topográficos y una potenciación de sus respuestas sensoriales (Coq y Xerri, 1998; Devonshire et al., 2010; Frostig, 2006).

Los efectos del enriquecimiento ambiental en las neuronas somatosensoriales primarias no han sido examinados hasta el momento, salvo por nuestro estudio, en el que demostramos cambios sustanciales en la expresión de un número de genes y proteínas relacionadas con la transmisión glutamatérgica en el TG y del que se discutirá más adelante (Fernández-Montoya et al., 2016).

La inducción de potenciación sináptica por la experiencia se ha estudiado de manera extensa en la corteza, y se ha considerado el sustrato neurobiológico fundamental para la plasticidad dependiente de la experiencia, el aprendizaje y la memoria (Cheetham et al., 2014; Fox y Wong, 2005; Froemke, 2015; Holtmaat y Svoboda, 2009). Los cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas también se han relacionado con la modificación

estructural de las propias sinapsis (Federmeier et al., 2002; Cheetham et al., 2014), y la sinaptogénesis y el aumento del número de contactos sinápticos se han considerado como el sustrato neural para el aprendizaje motor (Black et al., 1990; Kleim et al., 2004), y una característica general del remodelado de los circuitos en respuesta a la experiencia (Gogolla et al., 2007). Nuestro estudio muestra un aumento considerable en el número y el tamaño de las varicosidades después del enriquecimiento, sin embargo, no podemos saber si ese aumento en el número de varicosidades, que se produce en todos los núcleos del trigémino, se debe a la aparición de nuevas varicosidades, al agrandamiento de varicosidades pequeñas ya existentes, o a una combinación de ambos procesos. De todas formas parece lógico pensar que el agrandamiento de botones presinápticos putativos tenga repercusiones funcionales, ya que se ha visto que el volumen de los botones se correlaciona con el área, con el número de las zonas activas que se localizan en él, y con la probabilidad de liberación de neurotransmisores (Cheetham et al., 2014; Federmeier et al., 2002; Schikorski y Stevens, 1997). De hecho, en estudios realizados en aferentes primarios de las vibrisas de gatos, se vio que existía una correlación positiva entre el volumen y el tamaño de los botones con la complejidad sináptica. Los botones de mayor volumen presentaban zonas activas más grandes (Nakagawa et al., 1997).

Es bastante posible que los efectos del enriquecimiento en la morfometría de las varicosidades no sean sólo presinápticos, sino el resultado de la interacción entre elementos pre- y postsinápticos. En primer lugar, el agrandamiento de las varicosidades no se produce en todos los núcleos a pesar de las similitudes de sus aferentes: la varicosidades aumenta su tamaño en Pr5 pero no en Sp5o, cuando la morfología de los árboles terminales en esos núcleos es indistinguible (Jacquin et al., 1993). Se puede pensar que los diferentes aferentes primarios que sinaptan en distintas neuronas en cada núcleo se vean afectados de forma diferente por la exposición al ambiente enriquecido. Los aferentes de Pr5, y en particular, los que se dirigen a las neuronas en la zona de los *barriletes* que representa a las vibrisas, son los más abundantes y reciben la mayor parte de su información desde los folículos de las vibrisas, mientras que las neuronas de Sp5o presentan una mayor diversidad morfológica, una notable convergencia de información que les llega desde una gran variedad de receptores en las regiones orofaciales y unas propiedades de respuesta que son distintas a las de otros núcleos del trigémino (Huopaniemi et al., 1992; Jacquin y Rhoades, 1990). Por lo tanto, se puede plantear la siguiente hipótesis: las neuronas que reciben más información de las vibrisas estarán más afectadas por cambios en la entrada sensorial relacionados con las mismas. Por lo tanto, a través de una señalización retrógrada, una neurona postsináptica puede influenciar una población específica de botones presinápticos para que genere más contactos o para que estos sean más eficientes (Gogolla et al., 2007).

En los receptores de glutamato del TG

Las ratas adultas aumentan su comportamiento exploratorio y por tanto el tacto activo, tras la exposición prolongada a ambientes enriquecidos (Polley et al., 2004; Valles et al., 2011). Estos cambios en el comportamiento se acompañan de una variedad de cambios estructurales y funcionales en la corteza de barriles, como el incremento en el grosor cortical y en el volumen del campo de barriles, la expansión de los somas y las dendritas neuronales, el aumento en número y tamaño de las sinapsis corticales, el refinamiento de los campos receptivos, la selectividad de sus respuestas y de los potenciales locales de campo en las áreas somatosensoriales (Coq y Xerri 1998; Devonshire et al. 2010; Diamond 2001; Greenough et al. 1973; Landers et al. 2011; Machín et al. 2004). Tras la exposición a periodos breves de enriquecimiento ambiental se han encontrado que una serie de factores de transcripción y de IEGs están sobreexpresados en la corteza de barriles de forma transitoria, aunque estos cambios no se detectaron o fueron muy limitados en núcleos talámicos y troncoencefálicos implicados en la transmisión de información trigeminal (Bisler et al., 2002; Staiger et al., 2000). Una exposición más prolongada a estos ambientes enriquecidos sí que es capaz de regular de forma diferencial la expresión de receptores de glutamato en diversas estructuras del SNC, y, quizá de manera no casual, algunos de estos cambios reflejan los cambios que nosotros hemos encontrado en el TG. En particular, hay un aumento en la expresión de las subunidades NMDAR2B, y NMDAR2A (pero no de NMDAR1) tras enriquecimiento (Andin et al., 2007; Shum et al., 2007; Tang et al., 2001). En nuestro estudio, la expresión de NMDAR2B también se veía aumentada tras enriquecimiento en el TG, presentando una llamativa diferencia de lado, que también se observaba en su gen codificante, *Grin2B*.

Gria1, es el gen que codifica para la subunidad GLUR1 de los receptores AMPA. Esta subunidad, está relacionada con el refuerzo de la eficacia sináptica en la corteza de barriles dependiente de la experiencia (Kessels y Malinow, 2009). La estimulación de las vibrisas hace que esta subunidad se inserte en las sinapsis cuando se producen fenómenos de LTP y además se ha relacionado con el aumento de las espinas dendríticas (Holtmaat y Svoboda, 2009; Kessels y Malinow, 2009). La expresión de *Gria1* en nuestro caso, fue más elevada en el TG izquierdo tras enriquecimiento ambiental, dando lugar a una diferencia de lados que no estaba presente en los controles. Esta expresión se mantuvo elevada en el lado izquierdo con respecto a los controles pero la expresión de su proteína codificante, GLUR1, no siguió este patrón sino que disminuyó tras el enriquecimiento en el TG izquierdo con respecto al control. Aunque estos resultados son difíciles de interpretar indican que una modificación “positiva” de la entrada sensorial produce una regulación diferencial tanto a nivel génico como a nivel proteico en la subunidad GLUR1 de los

receptores AMPA. El gen codificante para otro receptor ionotrópico, *Gria4*, también mostró una expresión elevada en el lado izquierdo tras exposición a un ambiente enriquecido, sus niveles proteicos, GLUR4, reflejaron el mismo cambio aunque esta diferencia no llegó a ser significativa. Parece ser que la subunidad GLUR4 puede ser enviada a las sinapsis de forma dependiente de la actividad (Malenka, 2003; Santos et al., 2009), en nuestro caso sus niveles proteicos se encuentran disminuidos tanto en el TG derecho como izquierdo en el grupo enriquecido comparado con el control. De forma especulativa esto podría deberse a un intento de regular la entrada de información que estaría aumentada durante el enriquecimiento, disminuyendo las síntesis de GLUR4 y su posible incorporación a las sinapsis. Este razonamiento parece estar en consonancia con el discutido anteriormente en el que los niveles de *Gria4* (en ambos lados) y de GLUR4 (sólo en el TG derecho) estaban aumentados con respecto a los controles tras privación por recorte de vibrisas.

Las subunidades de receptores metabotrópicos estudiadas en nuestro caso, pertenecen a los grupos II y III, se ha visto que estas subunidades son principalmente presinápticas y están implicadas en la reducción de liberación del neurotransmisor (Conn y Pin, 1997). Estos grupos de receptores están representados en casi todas las neuronas de los DRGs y del TG, con una predominancia de mGLUR8 que se encuentra en las neuronas de todos los tamaños, seguido de mGLUR2/3 en las neuronas de tamaño pequeño-medio y una expresión más generalizado en otros tipos celulares del TG (Boye Larsen et al., 2014; Carlton y Hargett, 2007). *Grm3*, el gen que codifica para la subunidad mGLUR3, muestra un aumento de expresión en el lado izquierdo tras enriquecimiento, debido principalmente a una reducción de su expresión en el lado derecho. Los genes que codifican para las subunidades 7 y 8 se encontraban regulados a la baja en nuestro estudio en el lado derecho tras enriquecimiento, lo que generó una asimetría entre lados que no estaba presente en controles. En el caso de *Grm8*, este descenso también se observó en los niveles de la proteína para la que codifica mGLUR8. Esto podría sugerir que la transmisión glutamatérgica podría estar aumentada en el lado derecho. Aunque es difícil de relacionar, es interesante resaltar que ratas adultas jóvenes, expuestas a enriquecimiento ambiental durante 10 semanas, presentaron un aumento en el volumen de la corteza de barriles izquierda (la diana principal de la almohadilla de vibrisas derecha) del 6-9%, comparadas con controles mantenidos en condiciones estándar de laboratorio (Machín et al., 2004).

Efectos de la alteración de la entrada sensorial en la inervación dual de Sp5c

Los aferentes de las vibrisas y los que provienen de otras zonas de la piel de la cara van dejando colaterales a lo largo de su recorrido que forman un pequeño parche terminal en la lámina V en la parte rostral de Sp5c, y arborizaciones más grandes y restringidas en las láminas III y IV en su parte caudal (Hayashi, 1980, 1982, 1985; Jacquin et al., 1986c; Shortland et al., 1995). Por el contrario, las fibras C amielínicas que viene de la piel de la cara se distribuyen exclusivamente en las láminas I-II de Sp5c (Kobayashi y Matsumura, 1996).

En el asta dorsal de la médula espinal, se ha visto que el patrón laminar de los aferentes primarios se altera cuando se producen daños en los nervios periféricos. Se observó que los aferente primarios mielínicos que normalmente inervan la lámina I y las láminas III-IV pero no la lámina II, invadían esta última profusamente tras daño permanente o reversible. Estos hechos, observados tras inyecciones intraaxonales de HRP en aferentes primarios aislados, o con trazado en masa con CTB-HRP, se interpretaron inicialmente como una respuesta de gemación axónica (*sprouting*) de las fibras A β (Coggeshall et al., 1997; Koerber et al., 1994; Shortland et al., 1997; Woolf et al., 1992, 1995), que iban a inervar monosinápticamente las neuronas de la lámina II (Kohama et al., 2000). Se sabe que la CTB es un marcador fiable de las neuronas primarias grandes, y que cuando se inyecta en nervios periférico, es captado de forma selectiva por los axones mielínicos, y transportado transganglionarmente a los terminales centrales en todas las láminas menos en la lámina II (Ambalavanar et al., 2003; Robertson et al., 1991; Robertson y Arvidsson, 1985; Wan et al., 1982). Sin embargo, algunos estudios han evidenciado que unas pocas neuronas de tamaño pequeño se marcan con CTB en los DRGs, así como la existencia de una pequeña cantidad de marcado por CTB en la lámina II en controles (Shehab y Hughes, 2011; Tong et al., 1999; Woolf et al., 1995).

Sin embargo, el mecanismo de gemación axónica central de fibras A β en la lámina II está sujeto a controversia, ya que otros laboratorios han encontrado otra explicación para interpretar el patrón de reorganización laminar de los aferentes primarios que se induce tras lesión en los nervios periféricos. Tong y su grupo (1999), observaron una población de fibras marcadas con CTB que aparecían en la lámina II tras transporte transganglionar de CTB o CTB-HRP, y estas se correspondía con fibras amielínicas que son las que de forma común inervan la lámina II. Ellos interpretaron que estas fibras amielínicas marcadas con CTB aparecían en respuesta a un cambio fenotípico en los aferentes de tipo C, los cuales tras lesión expresaban en su membrana el monogangliósido GM1, y como consecuencia adquirían la capacidad de captar y transportar CTB. De

acuerdo con estos hechos, Santha y colaboradores (2003) encontraron que el número de fibras amielínicas que contenían CTB-HRP aumentaba 7 veces, en la médula espinal tras transección del nervio ciático. También el grupo de Shehab (Shehab et al., 2003) halló que muchas neuronas peptidérgicas pequeñas en el DRG captaban CTB inyectada en un nervio previamente cortado. Además, dos experimentos alternativos mostraron que sólo aparece gemación axónica de fibras A de forma marginal en la parte interna de la lámina II cuando se inyectaba CTB antes de axotomizar el nervio ciático (Bao et al., 2002), y que ni tras la inyección intraaxonal de Neurobiotina en aferentes A β aislados, ni tras el marcado en masa de los axones de las columnas dorsales con dextranos biotinilados varias semanas después de la axotomía del nervio ciático aparecen axones marcados en la mitad externa de la lámina II (Hughes et al., 2003). Más recientemente otros trabajos han confirmado estos hallazgos y han respaldado la hipótesis del cambio fenotípico de las neuronas pequeñas de los DRG tras daño axónico (Oszlács et al., 2015; Woodbury et al., 2008). El único estudio comparable en el territorio del IoN, en el que se estudiaban terminales A β de células marcadas genéticamente que expresaban parvalbúmina en el TG, tampoco encontró apoyo para la teoría de la gemación de brotes axónicos reactivos en la lámina II, ni tras inflamación, ni tras sección del nervio (Zhang et al., 2015).

Aunque no se puede excluir la existencia de un pequeño grado de gemación en las fibras A β marcadas con CTB, al menos en la mitad interna de la lámina II, nuestras observaciones apoyan más la opción de que las fibras C marcadas con IB4 adquieran la capacidad de captar CTB, ya que la mayor parte de los perfiles marcados en la lámina II se corresponden con varicosidades pequeñas y perfiles axónicos finos. Los datos limitados que tenemos sobre la colocalización de CTB también apoyan este razonamiento. Añadiendo a esta controversia la observación de que el cambio fenotípico se conseguiría también en ausencia de daño en el nervio, lo que sugiere que este fenómeno podría tener un papel más general en la plasticidad dependiente de la experiencia.

Consideraciones finales

Las formas de expresión de la plasticidad dependiente de entrada sensorial son múltiples e incluyen desde cambios sinápticos locales al remodelado de mapas sensoriales y adaptaciones comportamentales. Se trata de un proceso dinámico, en el que un gran número de mecanismos moleculares, celulares y circuitales se activan a lo largo del tiempo y del espacio para responder a los cambios en la experiencia (Feldman, 2009; Turrigiano, 2011; Xerri, 2012). Durante un largo periodo de tiempo las neuronas sensitivas primarias maduras se han considerado estructuras relativamente pasivas, que no jugaban más que un papel instrumental y de soporte en la transferencia y distribución de la información

sensorial hacia el SNC. Incluso en condiciones de daño del tejido periférico, el papel atribuido a estas neuronas se atenuaba cuando el dolor agudo evolucionaba a una situación de dolor crónico (Krames, 2015). Sin embargo, las estructuras subcorticales también se modifican con la experiencia y se ha propuesto que contribuyen de forma sustancial a la plasticidad que se detecta en niveles superiores del sistema neural (Kaas et al., 1999). Nuestro trabajo apoya esta visión de los fenómenos plásticos. La primera neurona, que es la que sustenta la transducción sensorial y conduce los mensajes hacia el sistema nervioso central, responde a las alteraciones en la entrada sensorial con cambios de expresión en genes y proteínas relacionados con la neurotransmisión (Fernández-Montoya et al., 2016), así como con cambios estructurales en las arborizaciones terminales de sus neuronas en el tronco del encéfalo. Aunque todavía no hay evidencias concluyentes, parece sensato especular que los cambios dependientes de la experiencia en los árboles dendríticos de las neuronas de segundo orden (Martin et al., 2014; Negredo et al., 2009) estén unidos a las modificaciones presinápticas halladas en esta tesis. Aunque los eventos postsinápticos lógicamente serían posteriores en el tiempo a los cambios presinápticos, la secuencia de tiempo podría variar en un cierto grado. En resumen, es necesario investigar de forma más amplia el fenómeno de plasticidad dependiente de la experiencia en los primeros pasos del procesamiento sensorial, la variedad de respuestas genómicas, moleculares y celulares que exhiben los ganglios sensitivos tras cambios en la entrada de información sensorial, ya que su comprensión podría sentar las bases para entender las situaciones de adaptación y los procesos de aprendizaje.

CONCLUSIONES

1. El TG muestra diferencias de lado en la expresión de genes y proteínas relacionados con la plasticidad sináptica, y en particular con la transmisión glutamatérgica, estos se ven afectados por la manipulación de la entrada sensorial.
2. El patrón de terminación central de los aferentes primarios que provienen de un único DVN se distribuye a lo largo de una columna alargada rostrocaudalmente, desde la zona más rostral de Pr5 hasta la lámina III de Sp5c, este patrón coincide con trabajos previos en los que se habían marcado los aferentes de forma masiva por inyección en el TG o aferentes únicos por inyección intraaxonal.
3. El patrón de terminación de los aferentes primarios que provienen de un único DVN tras privación del tacto activo por recorte de vibrisas no sufre ningún cambio en el volumen del territorio que inerva en ninguno de los núcleos analizados, mientras que produce un aumento en el número y el tamaño de las varicosidades restringido al núcleo Sp5c.
4. La privación del tacto háptico por recorte de vibrisas induce modificaciones bilaterales en la expresión de las moléculas implicadas en la neurotransmisión glutamatérgica en el TG, produciéndose en su mayoría un aumento de expresión en el lado derecho.
5. La exposición a un ambiente enriquecido modifica sustancialmente el patrón de terminación de los aferentes primarios que provienen de un único DVN aumentando el territorio que inervan y el número y tamaño de sus varicosidades.
6. La exposición a un ambiente enriquecido produce de forma generalizada una reducción en la expresión de genes relacionados con la neurotransmisión glutamatérgica en el TG derecho, lo que conlleva un aumento de las asimetrías que hay en los controles.
7. El modelo anatómico de marcado de aferentes primarios puesto a punto en este trabajo ha demostrado ser de gran utilidad para el estudio de los cambios plásticos a largo plazo inducidos por modificaciones de la entrada sensorial. Además el estudio molecular pone de manifiesto que las mismas modificaciones de la información sensorial son capaces de producir cambios de expresión en genes y proteínas

relacionadas con la neurotransmisión glutamatérgica en el TG, lugar donde residen los somas de estas fibras sensitivas primarias.

8. El trabajo de esta Tesis muestra por primera vez que modificaciones de la entrada sensorial, que no implican daños en la vía, inducen cambios anatómicos y moleculares en el TG y que la plasticidad dependiente de experiencia se encuentra también en niveles más periféricos de la vía, incluida la neurona sensorial primaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahissar E, Arieli A. 2001. Figuring space by time. *Neuron*. 32:185–201.
- Ahissar E, Knutsen PM. 2008. Object localization with whiskers. *Biol Cybern*. 98:449–458.
- Allen CB, Celikel T, Feldman DE. 2003. Long-term depression induced by sensory deprivation during cortical map plasticity in vivo. *Nat Neurosci*. 6:291–299.
- Alvarez J, Giuditta A, Koenig E. 2000. Protein synthesis in axons and terminals: significance for maintenance, plasticity and regulation of phenotype. With a critique of slow transport theory. *Prog Neurobiol*. 62:1–62.
- Alwis DS, Rajan R. 2014. Environmental enrichment and the sensory brain: the role of enrichment in remediating brain injury. *Front Syst Neurosci*. 8:156.
- Ambalavanar R, Moritani M, Haines A, Hilton T, Dessem D. 2003. Chemical phenotypes of muscle and cutaneous afferent neurons in the rat trigeminal ganglion. *J Comp Neurol*. 460:167–179.
- Andin J, Hallbeck M, Mohammed AH, Marcusson J. 2007. Influence of environmental enrichment on steady-state mRNA levels for EAAC1, AMPA1 and NMDA2A receptor subunits in rat hippocampus. *Brain Res*. 1174:18–27.
- Andres KH. 1966. On the microstructure of receptor on sinus hair. *Z Zellforsch*. 75:338–365.
- Araki T, Kenimer JG, Nishimune A, Sugiyama H, Yoshimura R, Kiyama H. 1993. Identification of the metabotropic glutamate receptor-1 protein in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res*. 627:341–344.
- Avendaño C. 2006. Neuroanatomical Tract Tracing: Molecules, Neurons, and Systems. In: Záborszky, L., Wouterlood, F. G., and Lanciego JL, editor. *Stereology of neural connections*. 3rd ed. New York: Springer Science & Business Media. p. 477–529.
- Avendaño C, Machín R, Bermejo PE, Lagares A. 2005. Neuron numbers in the sensory trigeminal nuclei of the rat: A GABA- and glycine-immunocytochemical and stereological analysis. *J Comp Neurol*. 493:538–553.
- Banke TG, Bowie D, Lee H, Huganir RL, Schousboe A, Traynelis SF. 2000. Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci*. 20:89–102.
- Bao L, Wang HF, Cai HJ, Tong YG, Jin SX, Lu YJ, Grant G, Hökfelt T, Zhang X. 2002. Peripheral axotomy induces only very limited sprouting of coarse myelinated afferents into inner lamina II of rat spinal cord. *Eur J Neurosci*. 16:175–185.
- Barbaresi P, Spreafico R, Frassoni C, Rustioni A. 1986. GABAergic neurons are present in the dorsal column nuclei but not in the ventroposterior complex of rats. *Brain Res*. 382:305–326.
- Barria A, Derkach V, Soderling T. 1997. Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J Biol Chem*. 272:32727–32730.
- Bates CA, Killackey HP. 1985. The organization of the neonatal rat's brainstem trigeminal complex and its role in the formation of central trigeminal patterns. *J Comp Neurol*. 240:265–287.
- Bennett EL, Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR. 1964. Chemical and anatomical plasticity brain. *Science*. 146:610–619.
- Bennett EL, Rosenzweig MR, Diamond MC, Morimoto H, Hebert M. 1974. Effects of successive environments on brain measures. *Physiol Behav*. 12:621–631.

- Berlucchi G, Buchtel HA. 2009. Neuronal plasticity: historical roots and evolution of meaning. *Exp brain Res*. 192:307–319.
- Bisler S, Schleicher A, Gass P, Stehle JH, Zilles K, Staiger JF. 2002. Expression of c-Fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: Time course of induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment. *J Chem Neuroanat*.
- Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT. 1990. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:5568–5572.
- Bosman LWJ, Houweling AR, Owens CB, Tanke N, Shevchouk OT, Rahmati N, Teunissen WHT, Ju C, Gong W, Koekkoek SKE, De Zeeuw CI. 2011. Anatomical pathways involved in generating and sensing rhythmic whisker movements. *Front Integr Neurosci*. 5:53.
- Bouvier G, Bidoret C, Casado M, Paoletti P. 2015. Presynaptic NMDA receptors: Roles and rules. *Neuroscience*. 311:322–340.
- Boye Larsen D, Ingemann Kristensen G, Panchalingam V, Laursen JC, Nørgaard Poulsen J, Skallerup Andersen M, Kandiah A, Gazerani P. 2014. Investigating the expression of metabotropic glutamate receptors in trigeminal ganglion neurons and satellite glial cells: implications for craniofacial pain. *J Recept Signal Transduct Res*. 9893:1–9.
- Brecht M, Preilowski B, Merzenich MM. 1997. Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav Brain Res*. 84:81–97.
- Brumovsky PR. 2013. VGLUTs in Peripheral Neurons and the Spinal Cord: Time for a Review. *ISRN Neurol*. 2013:829753.
- Cahusac PMB, Mavulati SC. 2009. Non-competitive metabotropic glutamate 1 receptor antagonists block activity of slowly adapting type I mechanoreceptor units in the rat sinus hair follicle. *Neuroscience*. 163:933–941.
- Carlton SM, Hargett GL. 2007. Colocalization of metabotropic glutamate receptors in rat dorsal root ganglion cells. *J Comp Neurol*. 501:780–789.
- Carlton SM, Hargett GL, Coggeshall RE. 2001. Localization of metabotropic glutamate receptors 2/3 on primary afferent axons in the rat. *Neuroscience*. 105:957–969.
- Carvell GE, Simons DJ. 1990. Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci*. 10:2638–2648.
- Castillo C, Norcini M, Martin Hernandez LA, Correa G, Blanck TJJ, Recio-Pinto E. 2013. Satellite glia cells in dorsal root ganglia express functional NMDA receptors. *Neuroscience*. 240:135–146.
- Castillo PE. 2012. Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4:a005728–a005728.
- Charych EI, Li R, Serwanski DR, Li X, Miralles CP, Pinal N, De Blas AL. 2006. Identification and characterization of two novel splice forms of GRIP1 in the rat brain. *J Neurochem*. 97:884–898.
- Cheetham CEJ, Barnes SJ, Albieri G, Knott GW, Finnerty GT. 2014. Pansynaptic enlargement at adult cortical connections strengthened by experience. *Cereb Cortex*. 24:521–531.
- Cheetham CEJ, Hammond MSL, Edwards CEJ, Finnerty GT. 2007. Sensory Experience Alters Cortical Connectivity and Synaptic Function Site Specifically. *J Neurosci*. 27:3456–3465.

- Chen C-C, Bajnath A, Brumberg JC. 2015. The impact of development and sensory deprivation on dendritic protrusions in the mouse barrel cortex. *Cereb Cortex*. 25:1638–1653.
- Chiaia NL, Rhoades RW, Bennett-Clarke CA, Fish SE, Killackey HP. 1991. Thalamic processing of vibrissal information in the rat. I. Afferent input to the medial ventral posterior and posterior nuclei. *J Comp Neurol*. 314:201–216.
- Chu Y-F, Yen C-T, Lee L-J. 2013. Neonatal whisker clipping alters behavior, neuronal structure and neural activity in adult rats. *Behav Brain Res*. 238:124–133.
- Citri A, Bhattacharyya S, Ma C, Morishita W, Fang S, Rizo J, Malenka RC. 2010. Calcium binding to PICK1 is essential for the intracellular retention of AMPA receptors underlying long-term depression. *J Neurosci*. 30:16437–16452.
- Clarkson C, Antunes FM, Rubio ME. 2016. Conductive Hearing Loss Has Long-Lasting Structural and Molecular Effects on Presynaptic and Postsynaptic Structures of Auditory Nerve Synapses in the Cochlear Nucleus. *J Neurosci*. 36:10214–10227.
- Cline H, Haas K. 2008. The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: a review of the synaptotrophic hypothesis. *J Physiol*. 586:1509–1517.
- Coggeshall RE, Lekan HA, Doubell TP, Allchorne A, Woolf CJ. 1997. Central changes in primary afferent fibers following peripheral nerve lesions. *Neuroscience*. 77:1115–1122.
- Conn PJ, Pin JP. 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 37:205–237.
- Coq JO, Xerri C. 1998. Environmental enrichment alters organizational features of the forepaw representation in the primary somatosensory cortex of adult rats. *Exp Brain Res*. 121:191–204.
- Corson J, Nahmani M, Lubarsky K, Badr N, Wright C, Erisir A. 2009. Sensory activity differentially modulates N-methyl-D-aspartate receptor subunits 2A and 2B in cortical layers. *Neuroscience*. 163:920–932.
- Crispino M, Chun JT, Cefaliello C, Perrone Capano C, Giuditta A. 2014. Local gene expression in nerve endings. *Dev Neurobiol*. 74:279–291.
- Crissman RS, Sodeman T, Denton AM, Warden RJ, Siciliano DA, Rhoades RW. 1996. Organization of primary afferent axons in the trigeminal sensory root and tract of the rat. *J Comp Neurol*. 364:169–183.
- Crissman RS, Warden RJ, Siciliano DA, Klein BG, Renehan WE, Jacquin MF, Rhoades RW. 1991. Numbers of axons innervating mystacial vibrissa follicles in newborn and adult rats. *Somatosens Mot Res*. 8:103–109.
- Cruz-Orive LM. 1999. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. *J Microsc*. 193:182–198.
- Darian-Smith C, Gilbert CD. 1995. Topographic reorganization in the striate cortex of the adult cat and monkey is cortically mediated. *J Neurosci*. 15:1631–1647.
- Deschênes M, Urbain N. 2009. Vibrissal afferents from trigeminus to cortices. [WWW Document]. Scholarpedia.
- Deschênes M, Veinante P, Zhang ZW. 1998. The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res Brain Res Rev*. 28:286–308.
- Devonshire IM, Dommett EJ, Grandy TH, Halliday AC, Greenfield SA. 2010. Environmental enrichment differentially modifies specific components of sensory-evoked activity in rat barrel cortex as revealed by simultaneous electrophysiological recordings and optical imaging in vivo. *Neuroscience*. 170:662–669.

- Devor M, Wall PD. 1978. Reorganisation of spinal cord sensory map after peripheral nerve injury. *Nature*. 276:75–76.
- Diamond MC. 1988. Enriching heredity. The impact of the environment on the anatomy of the brain. New York: Free Press.
- Diamond MC. 2001. Response of the brain to enrichment. *An Acad Bras Cienc*. 73:210–220.
- Diamond MC, Greer ER, York A, Lewis D, Barton T, Lin J. 1987. Rat cortical morphology following crowded-enriched living conditions. *Exp Neurol*. 96:241–247.
- Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR. 1964. The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*. 123:111–120.
- Diamond ME. 1995. Somatosensory thalamus of the rat. In: Jones EG DI, editor. *Cerebral Cortex* vol.11. New York: Plenum Press. p. 189–219.
- Diamond ME, Arabzadeh E. 2013. Whisker sensory system - from receptor to decision. *Prog Neurobiol*. 103:28–40.
- Diamond ME, Armstrong-James M, Ebner FF. 1992. Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus. *J Comp Neurol*. 318:462–476.
- Diamond ME, Armstrong-James M, Ebner FF. 1993. Experience-dependent plasticity in adult rat barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2082–2086.
- Dolan S, Cahusac PMB. 2007. Enhanced short-latency responses in the ventral posterior medial (VPM) thalamic nucleus following whisker trimming in the adult rat. *Physiol Behav*. 92:500–506.
- Dörfl J. 1985. The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *J Anat*. 142:173–184.
- Dubový P, Brázda V, Klusáková I, Hradilová-Svíženská I. 2013. Bilateral elevation of interleukin-6 protein and mRNA in both lumbar and cervical dorsal root ganglia following unilateral chronic compression injury of the sciatic nerve. *J Neuroinflammation*. 10:55.
- Ebara S, Kumamoto K, Matsuura T, Mazurkiewicz JE, Rice FL. 2002. Similarities and differences in the innervation of mystacial vibrissal follicle-sinus complexes in the rat and cat: a confocal microscopic study. *J Comp Neurol*. 449:103–119.
- Engert F, Bonhoeffer T. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*. 399:66–70.
- Erzurumlu RS, Killackey HP. 1979. Efferent connections of the brainstem trigeminal complex with the facial nucleus of the rat. *J Comp Neurol*. 188:75–86.
- Erzurumlu RS, Killackey HP. 1980. Diencephalic projections of the subnucleus interpolaris of the brainstem trigeminal complex in the rat. *Neuroscience*. 5:1891–1901.
- Erzurumlu RS, Killackey HP. 1983. Development of order in the rat trigeminal system. *J Comp Neurol*. 213:365–380.
- Erzurumlu RS, Kind PC. 2001. Neural activity: sculptor of “barrels” in the neocortex. *Trends Neurosci*. 24:589–595.
- Erzurumlu RS, Murakami Y, Rijli FM. 2010. Mapping the face in the somatosensory brainstem. *Nat Rev Neurosci*. 11:252–263.
- Faherty CJ, Kerley D, Smeyne RJ. 2003. A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Brain Res Dev Brain Res*. 141:55–61.
- Fanselow EE, Nicolelis MA. 1999. Behavioral modulation of tactile responses in the rat somatosensory system. *J Neurosci*. 19:7603–7616.

- Federmeier KD, Kleim JA, Greenough WT. 2002. Learning-induced multiple synapse formation in rat cerebellar cortex. *Neurosci Lett.* 332:180–184.
- Feldman DE. 2009. Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu Rev Neurosci.* 32:33–55.
- Fernández-Montoya J, Buendia I, Martin YB, Egea J, Negredo P, Avendaño C. 2016. Sensory Input-Dependent Changes in Glutamatergic Neurotransmission- Related Genes and Proteins in the Adult Rat Trigeminal Ganglion. *Front Mol Neurosci.* 9:1–14.
- Ferrari LF, Lotufo CM, Araldi D, Rodrigues MA, Macedo LP, Ferreira SH, Parada CA. 2014. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:18363–18368.
- Fischer M, Kaech S, Wagner U, Brinkhaus H, Matus A. 2000. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat Neurosci.* 3:887–894.
- Florence SL, Kaas JH. 1995. Large-scale reorganization at multiple levels of the somatosensory pathway follows therapeutic amputation of the hand in monkeys. *J Neurosci.* 15:8083–8095.
- Fox K. 1992. A critical period for experience-dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex. *J Neurosci.* 12:1826–1838.
- Fox K. 1994. The cortical component of experience-dependent synaptic plasticity in the rat barrel cortex. *J Neurosci.* 14:7665–7679.
- Fox K. 2002. Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience.* 111:799–814.
- Fox K. 2008. *Barrel Cortex*. First. ed. New York: Cambridge University Press.
- Fox K, Wong ROL. 2005. A comparison of experience-dependent plasticity in the visual and somatosensory systems. *Neuron.* 48:465–477.
- Frome RC. 2015. Plasticity of cortical excitatory-inhibitory balance. *Annu Rev Neurosci.* 38:195–219.
- Frostig RD. 2006. Functional organization and plasticity in the adult rat barrel cortex: moving out-of-the-box. *Curr Opin Neurobiol.* 16:445–450.
- Fuchs JL, Salazar E. 1998. Effects of whisker trimming on GABA(A) receptor binding in the barrel cortex of developing and adult rats. *J Comp Neurol.* 395:209–216.
- Fukuoka T, Kondo E, Dai Y, Hashimoto N, Noguchi K. 2001. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J Neurosci.* 21:4891–4900.
- Garraghty PE, Kaas JH. 1991. Functional reorganization in adult monkey thalamus after peripheral nerve injury. *Neuroreport.* 2:747–750.
- Gierdalski M, Jablonska B, Siucinska E, Lech M, Skibinska A, Kossut M. 2001. Rapid regulation of GAD67 mRNA and protein level in cortical neurons after sensory learning. *Cereb Cortex.* 11:806–815.
- Gierdalski M, Jablonska B, Smith A, Skangiel-Kramska J, Kossut M. 1999. Deafferentation induced changes in GAD67 and GluR2 mRNA expression in mouse somatosensory cortex. *Mol Brain Res.* 71:111–119.
- Ginestal E, Matute C. 1993. Gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the rat trigeminal nuclei. *Histochemistry.* 99:49–55.
- Giuditta A, Kaplan BB, van Minnen J, Alvarez J, Koenig E. 2002. Axonal and presynaptic protein synthesis: new insights into the biology of the neuron. *Trends Neurosci.* 25:400–404.

- Glazewski S, Chen CM, Silva A, Fox K. 1996. Requirement for alpha-CaMKII in experience-dependent plasticity of the barrel cortex. *Science*. 272:421–423.
- Glazewski S, Fox K. 1996. Time course of experience-dependent synaptic potentiation and depression in barrel cortex of adolescent rats. *J Neurophysiol*. 75:1714–1729.
- Glazewski S, Giese KP, Silva A, Fox K. 2000. The role of alpha-CaMKII autophosphorylation in neocortical experience-dependent plasticity. *Nat Neurosci*. 3:911–918.
- Glazewski S, Herman C, McKenna M, Chapman PF, Fox K. 1998b. Long-term potentiation in vivo in layers II/III of rat barrel cortex. *Neuropharmacology*. 37:581–592.
- Glazewski S, McKenna M, Jacquin MF, Fox K. 1998a. Experience-dependent depression of vibrissae responses in adolescent rat barrel cortex. *Eur J Neurosci*. 10:2107–2116.
- Gogolla N, Galimberti I, Caroni P. 2007. Structural plasticity of axon terminals in the adult. *Curr Opin Neurobiol*. 17:516–524.
- Govea RM, Zhou S, Carlton SM. 2012. Group III metabotropic glutamate receptors and transient receptor potential vanilloid 1 co-localize and interact on nociceptors. *Neuroscience*. 217:130–139.
- Greenough WT, Volkmar FR, Juraska JM. 1973. Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Exp Neurol*. 41:371–378.
- Gregg JM, Dixon A. 1973. Somatotopic organization of the trigeminal ganglion in the rat. *Archs oral Biol*. 18:487–498.
- Grossman AW, Churchill JD, Bates KE, Kleim JA, Greenough WT. 2002. A brain adaptation view of plasticity: is synaptic plasticity an overly limited concept? *Prog Brain Res*. 138:91–108.
- Guic E, Carrasco X, Rodríguez E, Robles I, Merzenich MM. 2008. Plasticity in primary somatosensory cortex resulting from environmentally enriched stimulation and sensory discrimination training. *Biol Res*. 41:425–437.
- Gundersen HJ. 1988. The nucleator. *J Microsc*. 151:3–21.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ. 1988. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 96:379–394.
- Gupta N, Sanyal S, Babbar R. 2008. Sensory nerve conduction velocity is greater in left handed persons. *Indian J Physiol Pharmacol*. 52:189–192.
- Haas K, Li J, Cline H. 2006. AMPA receptors regulate experience-dependent dendritic arbor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:12127–12131.
- Haglerod C, Kapic A, Boulland JL, Hussain S, Holen T, Skare O, Laake P, Ottersen OP, Haug FMS, Davanger S. 2009. Protein interacting with C kinase 1 (PICK1) and GluR2 are associated with presynaptic plasma membrane and vesicles in hippocampal excitatory synapses. *Neuroscience*. 158:242–252.
- Hallas BH, Jacquin MF. 1990. Structure-function relationships in rat brain stem subnucleus interpolaris. IX. Inputs from subnucleus caudalis. *J Neurophysiol*. 64:28–45.
- Hanani M. 2005. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev*. 48:457–476.
- Hardingham N, Fox K. 2006. The Role of Nitric Oxide and GluR1 in Presynaptic and Postsynaptic Components of Neocortical Potentiation. *J Neurosci*. 26:7395–7404.

- Hayashi H. 1980. Distributions of vibrissae afferent fiber collaterals in the trigeminal nuclei as revealed by intra-axonal injection of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 183:442–446.
- Hayashi H. 1982. Differential terminal distribution of single large cutaneous afferent fibers in the spinal trigeminal nucleus and in the cervical spinal dorsal horn. *Brain Res.* 244:173–177.
- Hayashi H. 1985. Morphology of central terminations of intra-axonally stained, large, myelinated primary afferent fibers from facial skin in the rat. *J Comp Neurol.* 237:195–215.
- Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R. 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science.* 287:2262–2267.
- He HY, Rasmusson DD, Quinlan EM. 2004. Progressive elevations in AMPA and GABAA receptor levels in deafferented somatosensory cortex. *J Neurochem.* 90:1186–1193.
- Hebb DO. 1949. *The organization of behavior. A neuropsychological theory.* New York: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- Heynen AJ, Yoon B-J, Liu C-H, Chung HJ, Hugarir RL, Bear MF. 2003. Molecular mechanism for loss of visual cortical responsiveness following brief monocular deprivation. *Nat Neurosci.* 6:854–862.
- Hickmott PW, Ethell IM. 2006. Dendritic plasticity in the adult neocortex. *Neurosci.* 12:16–28.
- Holloway RL. 1966. Dendritic branching: some preliminary results of training and complexity in rat visual cortex. *Brain Res.* 2:393–396.
- Holtmaat A, Svoboda K. 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci.* 10:647–658.
- Holtmaat A, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW, Svoboda K. 2005. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron.* 45:279–291.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1970. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol.* 206:419–436.
- Hughes DI, Scott DT, Todd AJ, Riddell JS. 2003. Lack of evidence for sprouting of Abeta afferents into the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn after nerve section. *J Neurosci.* 23:9491–9499.
- Huopaniemi T, Jyväsjärvi E, Carlson S, Lindroos F, Pertovaara A. 1992. Response characteristics of tooth pulp-driven postsynaptic neurons in the spinal trigeminal subnucleus oralis of the cat. *Acta Physiol Scand.* 144:177–183.
- Jacquin MF, Arends JJ, Renahan WE, Waite PME, Shortland PJ. 2014. Whisker-related circuitry in the trigeminal nucleus principalis: Topographic precision. *Somatosens Mot Res.* 32:8–20.
- Jacquin MF, Barcia M, Rhoades RW. 1989a. Structure-function relationships in rat brainstem subnucleus interpolaris: IV. Projection neurons. *J Comp Neurol.* 282:45–62.
- Jacquin MF, Chiaia NL, Haring JH, Rhoades RW. 1990a. Intersubnuclear connections within the rat trigeminal brainstem complex. *Somatosens Mot Res.* 7:399–420.
- Jacquin MF, Golden J, Rhoades RW. 1989b. Structure-function relationships in rat brainstem subnucleus interpolaris: III. Local circuit neurons. *J Comp Neurol.* 282:24–44.

- Jacquin MF, Hess A, Yang G, Adamo P, Math MF, Brown A, Rhoades RW. 1984. Organization of the infraorbital nerve in rat: a quantitative electron microscopic study. *Brain Res.* 290:131–135.
- Jacquin MF, Mooney RD, Rhoades RW. 1986b. Morphology, response properties, and collateral projections of trigeminothalamic neurons in brainstem subnucleus interpolaris of rat. *Exp brain Res.* 61:457–468.
- Jacquin MF, Renehan WE, Mooney RD, Rhoades RW. 1986c. Structure-function relationships in rat medullary and cervical dorsal horns. I. Trigeminal primary afferents. *J Neurophysiol.* 55:1153–1186.
- Jacquin MF, Renehan WE, Rhoades RW, Panneton WM. 1993. Morphology and topography of identified primary afferents in trigeminal subnuclei principalis and oralis. *J Neurophysiol.* 70:1911–1936.
- Jacquin MF, Rhoades RW. 1990. Cell structure and response properties in the trigeminal subnucleus oralis. *Somatosens Mot Res.* 7:265–288.
- Jacquin MF, Wiegand MR, Renehan WE. 1990b. Structure-function relationships in rat brain stem subnucleus interpolaris. VIII. Cortical inputs. *J Neurophysiol.* 64:3–27.
- Jacquin MF, Woerner D, Szczepanik AM, Riecker V, Mooney RD, Rhoades RW. 1986a. Structure-function relationships in rat brainstem subnucleus interpolaris. I. Vibrissa primary afferents. *J Comp Neurol.* 243:266–279.
- James W. 1890. *The principles of psychology*. New York: Holt,.
- Kaas JH, Florence SL, Jain N. 1999. Subcortical contributions to massive cortical reorganizations. *Neuron.* 22:657–660.
- Kai-Kai MA. 1989. Cytochemistry of the trigeminal and dorsal root ganglia and spinal cord of the rat. *Comp Biochem Physiol.* 93:183–193.
- Kätzel D, Miesenböck G. 2014. Experience-dependent rewiring of specific inhibitory connections in adult neocortex. *PLoS Biol.* 12:e1001798.
- Kawakami R, Shinohara Y, Kato Y. 2003. Asymmetrical Allocation of NMDA Receptor epsilon2 Subunits in Hippocampal Circuitry. 300:990–994.
- Kendzierski C, Irizarry RA, Chen K-S, Haag JD, Gould MN. 2005. On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci.* 102:4252–4257.
- Kessels HW, Malinow R. 2009. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron.* 61:340–350.
- Killackey HP, Erzurumlu RS. 1981. Trigeminal projections to the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol.* 201:221–242.
- Killackey HP, Jacquin MF, Rhoades RW. 1990. Development of somatosensory system structures. In: Coleman JM, editor. *Development of sensory systems in mammals*. New York: John Wiley & Sons. p. 403–429.
- Killackey HP, Koralek KA, Chiaia NL, Rhoades RW. 1989. Laminar and areal differences in the origin of the subcortical projection neurons of the rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol.* 282:428–445.
- Kim DS, Lee SJ, Park SY, Yoo HJ, Kim SH, Kim KJ, Cho HJ. 2001. Differentially expressed genes in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *Neuroreport.* 12:3401–3405.
- Kirkman TW. 1996. *Statistic to use*.
- Kleim JA, Hogg TM, VandenBerg PM, Cooper NR, Bruneau R, Remple M. 2004. Cortical synaptogenesis and motor map reorganization occur during late, but not early, phase of motor skill learning. *J Neurosci.* 24:628–633.

- Kleinfeld D, Berg RW, O'Connor SM. 1999. Anatomical loops and their electrical dynamics in relation to whisking by rat. *Somatosens Mot Res.* 16:69–88.
- Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E. 2002. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron.* 34:265–273.
- Kobayashi Y, Matsumura G. 1996. Central projections of primary afferent fibers from the rat trigeminal nerve labeled with isolectin B4-HRP. *Neurosci Lett.* 217:89–92.
- Koerber HR, Mirnics K, Brown PB, Mendell LM. 1994. Central sprouting and functional plasticity of regenerated primary afferents. *J Neurosci.* 14:3655–3671.
- Kohama I, Ishikawa K, Kocsis JD. 2000. Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: aberrant innervation of lamina II neurons by Abeta afferents. *J Neurosci.* 20:1538–1549.
- Kohl MM, Shipton OA, Deacon RM, Rawlins JNP, Deisseroth K, Paulsen O. 2011. Hemisphere-specific optogenetic stimulation reveals left-right asymmetry of hippocampal plasticity. *Nat Neurosci.* 14:1413–1415.
- Kolb B, Gibb R, Gorny G. 2003. Experience-dependent changes in dendritic arbor and spine density in neocortex vary qualitatively with age and sex. *Neurobiol Learn Mem.* 79:1–10.
- Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB. 1999. Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci.* 22:122–127.
- Kossut M, Hand P. 1984. Early development of changes in cortical representation of C3 vibrissa following neonatal denervation of surrounding vibrissa receptors: a 2-deoxyglucose study in the rat. *Neurosci Lett.* 46:7–12.
- Kossut M, Juliano SL. 1999. Anatomical correlates of representational map reorganization induced by partial vibrissotomy in the barrel cortex of adult mice. *Neuroscience.* 92:807–817.
- Krames ES. 2015. The dorsal root ganglion in chronic pain and as a target for neuromodulation: A review. *Neuromodulation.* 18:24–32.
- Krech D, Rosenzweig MR, Bennett EL. 1960. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. *J Comp Physiol Psychol.* 53:509–519.
- Kung L-H, Gong K, Adedoyin M, Ng J, Bhargava A, Ohara PT, Jasmin L. 2013. Evidence for Glutamate as a Neuroglial Transmitter within Sensory Ganglia. *PLoS One.* 8.
- Lagares A, Avendaño C. 2000. Lateral asymmetries in the trigeminal ganglion of the male rat. *Brain Res.* 865:202–210.
- LaMendola NP, Bever TG. 1997. Peripheral and cerebral asymmetries in the rat. *Science.* 278:483–486.
- Land PW, de Blas AL, Reddy N. 1995. Immunocytochemical localization of GABAA receptors in rat somatosensory cortex and effects of tactile deprivation. *Somatosens Mot Res.* 12:127–141.
- Landers MS, Knott GW, Lipp HP, Poletaeva I, Welker E. 2011. Synapse formation in adult barrel cortex following naturalistic environmental enrichment. *Neuroscience.* 199:143–152.
- Larsen JO. 1998. Stereology of nerve cross sections. *J Neurosci Methods.* 85:107–118.
- Lee CJ, Bardoni R, Tong CK, Engelman HS, Joseph DJ, Magherini PC, MacDermott AB. 2002. Functional expression of AMPA receptors on central terminals of rat dorsal root ganglion neurons and presynaptic inhibition of glutamate release. *Neuron.* 35:135–146.

- Lee L-J. 2005. NMDA Receptor-Dependent Regulation of Axonal and Dendritic Branching. *J Neurosci.* 25:2304–2311.
- Lee L-J, Chen W-J, Chuang Y-W, Wang Y-C. 2009. Neonatal whisker trimming causes long-lasting changes in structure and function of the somatosensory system. *Exp Neurol.* 219:524–532.
- Li JY, Wang X, Ji PT, Li XF, Guan GH, Jiang XS, Zhou GS, Hua F, Wang N. 2012. Peripheral nerve injury decreases the expression of metabotropic glutamate receptor 7 in dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett.* 531:52–56.
- Liu CN, Chambers WW. 1958. Intrasprouting of dorsal root axons; development of new collaterals and preterminals following partial denervation of the spinal cord in the cat. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 79:46–61.
- Liu H, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI. 1995. Co-injection of wheat germ agglutinin-HRP and cholera toxin-HRP into the sciatic nerve of the rat blocks transganglionic transport. *J Histochem Cytochem.* 43:489–495.
- Lo FS, Guido W, Erzurumlu RS. 1999. Electrophysiological properties and synaptic responses of cells in the trigeminal principal sensory nucleus of postnatal rats. *J Neurophysiol.* 82:2765–2775.
- Lu C-R, Hwang SJ, Phend KD, Rustioni A, Valtschanoff J. 2002. Primary afferent terminals in spinal cord express presynaptic AMPA receptors. *J Neurosci.* 22:9522–9529.
- Lu CR, Hwang SJ, Phend KD, Rustioni A, Valtschanoff J. 2003. Primary afferent terminals that express presynaptic NR1 in rats are mainly from myelinated, mechanosensitive fibers. *J Comp Neurol.* 460:191–202.
- Luscher C, Malenka RC. 2012. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a005710–a005710.
- Ma PM. 1991. The barrelettes--architectonic vibrissal representations in the brainstem trigeminal complex of the mouse. I. Normal structural organization. *J Comp Neurol.* 309:161–199.
- Ma QP, Hargreaves RJ. 2000. Localization of N-methyl-D-aspartate NR2B subunits on primary sensory neurons that give rise to small-caliber sciatic nerve fibers in rats. *Neuroscience.* 101:699–707.
- Machín R, Blasco B, Bjugn R, Avendaño C. 2004. The size of the whisker barrel field in adult rats: minimal nondirectional asymmetry and limited modifiability by chronic changes of the sensory input. *Brain Res.* 1025:130–138.
- Machín R, Pérez-Cejuela CG, Bjugn R, Avendaño C. 2006. Effects of long-term sensory deprivation on asymmetric synapses in the whisker barrel field of the adult rat. *Brain Res.* 1107:104–110.
- Maier DL, Grieb GM, Stelzner DJ, McCasland JS. 2003. Large-scale plasticity in barrel cortex following repeated whisker trimming in young adult hamsters. *Exp Neurol.* 184:737–745.
- Malenka RC. 2003. Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann N Y Acad Sci.* 1003:1–11.
- Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. 1999. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science.* 283:1923–1927.
- Mantle-St John LA, Tracey DJ. 1987. Somatosensory nuclei in the brainstem of the rat: independent projections to the thalamus and cerebellum. *J Comp Neurol.* 255:259–271.

- Martin YB, Avendaño C. 2009. Effects of Removal of Dietary Polyunsaturated Fatty Acids on Plasma Extravasation and Mechanical Allodynia in a Trigeminal Neuropathic Pain Model. *Mol Pain*. 25:5–8.
- Martin YB, Negredo P, Villacorta-Atienza JA, Avendaño C. 2014. Trigeminal intersubnuclear neurons: Morphometry and input-dependent structural plasticity in adult rats. *J Comp Neurol*. 522:1597–1617.
- Marvizón JC, McRoberts JA, Ennes HS, Song B, Wang X, Jinton L, Corneliussen B, Mayer EA. 2002. Two N-methyl-D-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. *J Comp Neurol*. 446:325–341.
- McKenzie A, Diamond MC, Greer ER, Woo L, Telles T. 1990. The effects of enriched environment on neural recovery following lesioning of the forelimb area of rat cortex. *Am Phys Ther Annu Conf*, Anaheim, CA.
- McMahon SB, Wall PD. 1983. Plasticity in the nucleus gracilis of the rat. *Exp Neurol*. 80:195–207.
- Menétrey D, De Pommery J, Baimbridge KG, Thomasset M. 1992. Calbindin-D28K (CaBP28k)-like Immunoreactivity in Ascending Projections. *Eur J Neurosci*. 4:61–69.
- Merzenich MM, Kaas JH, Wall J, Nelson RJ, Sur M, Felleman DJ. 1983a. Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience*. 8(1):33–55.
- Merzenich MM, Kaas JH, Wall JT, Sur M, Nelson RJ, Felleman DJ. 1983b. Progression of change following median nerve section in the cortical representation of the hand in areas 3b and 1 in adult owl and squirrel monkeys. *Neuroscience*. 10:639–665.
- Micheva KD, Beaulieu C. 1995. An anatomical substrate for experience-dependent plasticity of the rat barrel field cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:11834–11838.
- Miller KE, Hoffman EM, Sutharshan M, Schechter R. 2011. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: Physiological and pathophysiological mechanisms. *Pharmacol Ther*. 130:283–309.
- Miller KE, Richards BA, Kriebel RM. 2002. Glutamine-, glutamine synthetase-, glutamate dehydrogenase- and pyruvate carboxylase-immunoreactivities in the rat dorsal root ganglion and peripheral nerve. *Brain Res*. 945:202–211.
- Miskimon M, Han S, Lee JJ, Ringkamp M, Wilson MA, Petralia RS, Dong X, Worley PF, Baraban JM, Reti IM. 2014. Selective expression of Narp in primary nociceptive neurons: Role in microglia/macrophage activation following nerve injury. *J Neuroimmunol*. 274:86–95.
- Miyoshi Y, Suemune S, Yoshida A, Takemura M, Nagase Y, Shigenaga Y. 1994. Central terminations of low-threshold mechanoreceptive afferents in the trigeminal nuclei interpolaris and caudalis of the cat. *J Comp Neurol*. 340:207–232.
- Mollgaard K, Diamond MC, Bennett EL, Rosenzweig MR, Lindner B. 1971. Quantitative synaptic changes with differential experience in rat brain. *Int J Neurosci*. 2:113–127.
- Mowery TM, Sarin RM, Kostylev P V, Garraghty PE. 2015. Differences in AMPA and GABAA/B/ receptor subunit expression between the chronically reorganized cortex and brainstem of adult squirrel monkeys. *Brain Res*. 1611:44–55.
- Mowery TM, Walls SM, Garraghty PE. 2013. AMPA and GABAA/B receptor subunit expression in the cortex of adult squirrel monkeys during peripheral nerve regeneration. *Brain Res*. 1520:80–94.

- Nakagawa S, Kurata S, Yoshida A, Nagase Y, Moritani M, Takemura M, Bae YC, Shigenaga Y. 1997. Ultrastructural observations of synaptic connections of vibrissa afferent terminals in cat principal sensory nucleus and morphometry of related synaptic elements. *J Comp Neurol.* 389:12–33.
- Negredo P, Martin YB, Lagares A, Castro J, Villacorta JA, Avendaño C. 2009. Trigeminothalamic barrelette neurons: Natural structural side asymmetries and sensory input-dependent plasticity in adult rats. *Neuroscience.* 163:1242–1254.
- Nicolelis MA, Chapin JK, Lin RC. 1992. Somatotopic maps within the zona incerta relay parallel GABAergic somatosensory pathways to the neocortex, superior colliculus, and brainstem. *Brain Res.* 577:134–141.
- Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M. 2004. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol Learn Mem.* 81:200–210.
- Oberlaender M, Ramirez A, Bruno RM. 2012. Sensory Experience Restructures Thalamocortical Axons during Adulthood. *Neuron.* 74:648–655.
- Olszewski J. 1950. On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol.* 92:401–413.
- Oszlács O, Jancsó G, Kis G, Dux M, Sántha P. 2015. Perineural capsaicin induces the uptake and transganglionic transport of cholera toxin B subunit by nociceptive C-fiber primary afferent neurons. *Neuroscience.* 311:243–252.
- Palazzo E, De Novellis V, Rossi F, Maione S. 2014a. Supraspinal metabotropic glutamate receptor subtype 8: A switch to turn off pain. *Amino Acids.* 46:1441–1448.
- Palazzo E, Marabese I, de Novellis V, Rossi F, Maione S. 2014b. Supraspinal metabotropic glutamate receptors: A target for pain relief and beyond. *Eur J Neurosci.* 39:444–454.
- Panetsos F, Nuñez A, Avendaño C. 1995. Local anaesthesia induces immediate receptive field changes in nucleus gracilis and cortex. *Neuroreport.* 7:150–152.
- Park TJ, Comer C, Carol A, Lu Y, Hong H-S, Rice FL. 2003. Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats: II. Peripheral structures, innervation, and selective lack of neuropeptides associated with thermoregulation and pain. *J Comp Neurol.* 465:104–120.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Centrecourt: Academic Press Australia.
- Peschanski M. 1984. Trigeminal afferents to the diencephalon in the rat. *Neuroscience.* 12:465–487.
- Pierret T, Lavallée P, Deschênes M. 2000. Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids. *J Neurosci.* 20:7455–7462.
- Polley DB, Kvasnák E, Frostig RD. 2004. Naturalistic experience transforms sensory maps in the adult cortex of caged animals. *Nature.* 429:67–71.
- Pouchelon G, Frangeul L, Rijli FM, Jabaudon D. 2012. Patterning of pre-thalamic somatosensory pathways. *Eur J Neurosci.* 35:1533–1539.
- Ramón y Cajal S. 1904. *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y los Vertebrados*. Madrid: Imprenta Hijos de Nicolás Moya.
- Ramón y Cajal S. 1914. *Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso*. Madrid: Imprenta Hijos de Nicolás Moya.
- Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y. 2000. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:12880–12884.

- Rema V, Armstrong-James M, Ebner FF. 1998. Experience-dependent plasticity of adult rat S1 cortex requires local NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 18:10196–10206.
- Rema V, Armstrong-James M, Jenkinson N, Ebner FF. 2006. Short exposure to an enriched environment accelerates plasticity in the barrel cortex of adult rats. *Neuroscience.* 140:659–672.
- Renehan WE, Munger BL. 1986. Degeneration and regeneration of peripheral nerve in the rat trigeminal system. I. Identification and characterization of the multiple afferent innervation of the mystacial vibrissae. *J Comp Neurol.* 246:129–145.
- Rice FL, Fundin BT, Arvidsson J, Aldskogius H, Johansson O. 1997. Comprehensive immunofluorescence and lectin binding analysis of vibrissal follicle sinus complex innervation in the mystacial pad of the rat. *J Comp Neurol.* 385:149–184.
- Riddle DR, Purves D. 1995. Individual variation and lateral asymmetry of the rat primary somatosensory cortex. *J Neurosci.* 15:4184–4195.
- Robertson B, Arvidsson J. 1985. Transganglionic transport of wheat germ agglutinin-HRP and cholera toxin B-subunit-HRP in rat trigeminal primary sensory neurons. *Brain Res.* 348:44–51.
- Robertson B, Perry MJ, Lawson SN. 1991. Populations of rat spinal primary afferent neurons with cholera toxin B-subunit binding compared with those labelled by markers for neurofilament and carbohydrate groups: a quantitative immunocytochemical study. *J Neurocytol.* 20:387–395.
- Ruiz-Marcos A, Valverde F. 1969. The temporal evolution of the distribution of dendritic spines in the visual cortex of normal and dark raised mice. *Exp brain Res.* 8:284–294.
- Samsam M, Coveñas R, Csillik B, Ahangari R, Yajeya J, Riquelme R, Narváez JA, Tramu G. 2001. Depletion of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide from the contralateral and ipsilateral caudal trigeminal nucleus following unilateral electrical stimulation of the trigeminal ganglion; a possible neurophysiological and neuroanatomical study. *J Chem Neuroanat.* 21:161–169.
- Sántha P, Jancsó G. 2003. Transganglionic transport of cholera toxin B-subunit by capsaicin-sensitive C-fibre afferents to the substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn after peripheral nerve section. *Neuroscience.* 116:621–627.
- Santos SD, Carvalho AL, Caldeira M V, Duarte CB. 2009. Regulation of AMPA receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience.* 158:105–125.
- Sato K, Kiyama H, Park HT, Tohyama M. 1993. AMPA, KA and NMDA receptors are expressed in the rat DRG neurones. *Neuroreport.* 4:1263–1265.
- Sawtell NB, Frenkel MY, Philpot BD, Nakazawa K, Tonegawa S, Bear MF. 2003. NMDA receptor-dependent ocular dominance plasticity in adult visual cortex. *Neuron.* 38:977–985.
- Schikorski T, Stevens CF. 1997. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci.* 17:5858–5867.
- Schubert V, Da Silva JS, Dotti CG. 2006. Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *J Cell Biol.* 172:453–467.
- Schubert V, Lebrecht D, Holtmaat A. 2013. Peripheral Deafferentation-Driven Functional Somatosensory Map Shifts Are Associated with Local, Not Large-Scale Dendritic Structural Plasticity. *J Neurosci.* 33:9474–9487.
- Sengelaub DR, Muja N, Mills AC, Myers WA, Churchill JD, Garraghty PE. 1997. Denervation-induced sprouting of intact peripheral afferents into the cuneate nucleus of adult rats. *Brain Res.* 769:256–262.

- Shehab SAS, Hughes DI. 2011. Simultaneous identification of unmyelinated and myelinated primary somatic afferents by co-injection of isolectin B4 and Cholera toxin subunit B into the sciatic nerve of the rat. *J Neurosci Methods*. 198:213–221.
- Shehab SAS, Spike RC, Todd AJ. 2003. Evidence against cholera toxin B subunit as a reliable tracer for sprouting of primary afferents following peripheral nerve injury. *Brain Res*. 964:218–227.
- Shin HC, Park S, Son J, Sohn JH. 1995. Responses from new receptive fields of VPL neurones following deafferentation. *Neuroreport*. 7:33–36.
- Shinohara Y, Hirase H, Watanabe M, Itakura M, Takahashi M, Shigemoto R. 2008. Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:19498–19503.
- Shortland P, Kinman E, Molander C. 1997. Sprouting of A-fibre primary afferents into lamina II in two rat models of neuropathic pain. *Eur J Pain*. 1:215–227.
- Shortland PJ, DeMaro JA, Jacquin MF. 1995. Trigeminal structure-function relationships: a reevaluation based on long-range staining of a large sample of brainstem alpha beta fibers. *Somatosens Mot Res*. 12:249–275.
- Shoykhet M, Land PW, Simons DJ. 2005. Whisker trimming begun at birth or on postnatal day 12 affects excitatory and inhibitory receptive fields of layer IV barrel neurons. *J Neurophysiol*. 94:3987–3995.
- Shum FWF, Wu LJ, Zhao MG, Toyoda H, Xu H, Ren M, Pinaud R, Ko SW, Lee YS, Kaang BK, Zhuo M. 2007. Alteration of cingulate long-term plasticity and behavioral sensitization to inflammation by environmental enrichment. *Learn Mem*. 14:304–312.
- Simons DJ, Carvell GE, Kyriazi HT. 2015. Alterations in functional thalamocortical connectivity following neonatal whisker trimming with adult regrowth. *J Neurophysiol*. 114:1912–1922.
- Simons DJ, Land PW. 1987. Early experience of tactile stimulation influences organization of somatic sensory cortex. *Nature*. 326:694–697.
- Smith RL. 1973. The ascending fiber projections from the principal sensory trigeminal nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 148:423–445.
- Staiger JF. 2006. Immediate-early gene expression in the barrel cortex. *Somatosens Mot Res*. 23:135–146.
- Staiger JF, Bisler S, Schleicher A, Gass P, Stehle JH, Zilles K. 2000. Exploration of a novel environment leads to the expression of inducible transcription factors in barrel-related columns. *Neuroscience*. 99:7–16.
- Staiger JF, Masannek C, Bisler S, Schleicher A, Zuschratter W, Zilles K. 2002. Excitatory and inhibitory neurons express c-Fos in barrel-related columns after exploration of a novel environment. *Neuroscience*. 109:687–699.
- Tachibana M, Wenthold RJ, Morioka H, Petralia RS. 1994. Light and electron microscopic immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat spinal cord. *J Comp Neurol*. 344:431–454.
- Tailby C, Wright LL, Metha AB, Calford MB. 2005. Activity-dependent maintenance and growth of dendrites in adult cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:4631–4636.
- Takahashi T. 2003. Experience Strengthening Transmission by Driving AMPA Receptors into Synapses. *Science* (80-). 299:1585–1588.
- Takamiya K, Mao L, Hugarir RL, Linden DJ. 2008. The glutamate receptor-interacting protein family of GluR2-binding proteins is required for long-term synaptic depression expression in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*. 28:5752–5755.

- Tan HL, Queenan BN, Huganir RL. 2015. GRIP1 is required for homeostatic regulation of AMPAR trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:10026–10031.
- Tan U. 1993. Sensory nerve conduction velocities are higher on the left than the right hand and motor conduction is faster on the right hand than left in right-handed normal subjects. *Int J Neurosci*. 73:85–91.
- Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ. 2001. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*. 41:779–790.
- Terashima A, Pelkey KA, Rah JC, Suh YH, Roche KW, Collingridge GL, McBain CJ, Isaac JTR. 2008. An Essential Role for PICK1 in NMDA Receptor-Dependent Bidirectional Synaptic Plasticity. *Neuron*. 57:872–882.
- Timofeeva E, Lavallée P, Arsenault D, Deschênes M. 2004. Synthesis of multiwhisker-receptive fields in subcortical stations of the vibrissa system. *J Neurophysiol*. 91:1510–1515.
- Tong YG, Wang HF, Ju G, Grant G, Hökfelt T, Zhang X. 1999. Increased uptake and transport of cholera toxin B-subunit in dorsal root ganglion neurons after peripheral axotomy: possible implications for sensory sprouting. *J Comp Neurol*. 404:143–158.
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K. 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*. 420:788–794.
- Tropea D, Kreiman G, Lyckman A, Mukherjee S, Yu H, Horng S, Sur M. 2006. Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci*. 9:660–668.
- Turrigiano G. 2011. Too many cooks? Intrinsic and synaptic homeostatic mechanisms in cortical circuit refinement. *Annu Rev Neurosci*. 34:89–103.
- Urbain N, Deschênes M. 2007. A new thalamic pathway of vibrissal information modulated by the motor cortex. *J Neurosci*. 27:12407–12412.
- Valles A, Boender AJ, Gijsbers S, Haast RAM, Martens GJM, de Weerd P. 2011. Genomewide Analysis of Rat Barrel Cortex Reveals Time- and Layer-Specific mRNA Expression Changes Related to Experience-Dependent Plasticity. *J Neurosci*. 31:6140–6158.
- Vallortigara G, Rogers LJ. 2005. Survival with an asymmetrical brain: advantages and disadvantages of cerebral lateralization. *Behav Brain Sci*. 28:575-89-633.
- Valverde F. 1967. Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse. *Exp brain Res*. 3:337–352.
- Valverde F, Ruiz-Marcos A. 1969. Dendritic spines in the visual cortex of the mouse: introduction to a mathematical model. *Exp brain Res*. 8:269–283.
- Van Der Loos H. 1976. Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci Lett*. 2:1–6.
- Van der Loos H, Woolsey TA. 1973. Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. *Science*. 179:395–398.
- Vees AM, Micheva KD, Beaulieu C, Descarries L. 1998. Increased number and size of dendritic spines in ipsilateral barrel field cortex following unilateral whisker trimming in postnatal rat. *J Comp Neurol*. 400:110–124.
- Veinante P, Deschênes M. 1999. Single- and multi-whisker channels in the ascending projections from the principal trigeminal nucleus in the rat. *J Neurosci*. 19:5085–5095.

- Veinante P, Jacquin MF, Deschênes M. 2000. Thalamic projections from the whisker-sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. *J Comp Neurol.* 420:233–243.
- von Banchet GS, Petrow PK, Bräuer R, Schaible HG. 2000. Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats. *Arthritis Res.* 2:424–427.
- Wagner L, Warwick RA, Pannicke T, Reichenbach A, Grosche A, Hanani M. 2014. Glutamate release from satellite glial cells of the murine trigeminal ganglion. *Neurosci Lett.* 578:143–147.
- Waite PM, Jacquin MF. 1992. Dual innervation of the rat vibrissa: responses of trigeminal ganglion cells projecting through deep or superficial nerves. *J Comp Neurol.* 322:233–245.
- Waite PM, Li L. 1993. Unmyelinated innervation of sinus hair follicles in rats. *Anat Embryol (Berl).* 188:457–465.
- Waite PM, Tracey DJ. 1995. Trigeminal sensory system. In: Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System*. San Diego: Academic Press Limited. p. 705–724.
- Waite PME, Jacquin MF. 1991. Responses of trigeminal ganglion cells projecting through deep or superficial vibrissal nerves. *Soc Neurosci Abstr.* 17:106.
- Wall JT, Felleman DJ, Kaas JH. 1983. Recovery of normal topography in the somatosensory cortex of monkeys after nerve crush and regeneration. *Science.* 221:771–773.
- Wall PD. 1977. The presence of ineffective synapses and the circumstances which unmask them. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 278:361–372.
- Wallace H, Fox K. 1999. The effect of vibrissa deprivation pattern on the form of plasticity induced in rat barrel cortex. *Somatosens Mot Res.* 16:122–138.
- Walsh RN. 1981. Effects of environmental complexity and deprivation on brain anatomy and histology: a review. *Int J Neurosci.* 12:33–51.
- Wan XC, Trojanowski JQ, Gonatas JO. 1982. Cholera toxin and wheat germ agglutinin conjugates as neuroanatomical probes: their uptake and clearance, transganglionic and retrograde transport and sensitivity. *Brain Res.* 243:215–224.
- Watson S. 2015. Modulating mechanosensory afferent excitability by an atypical mGluR. *J Anat.* 227:214–220.
- Welker E, Soriano E, Dörfl J, Van der Loos H. 1989. Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: transient increase of GAD-immunoreactivity following sensory stimulation. *Exp brain Res.* 78:659–664.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 231:482–497.
- Wiesel TN, Hubel DH. 1963. Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J Neurophysiol.* 26:1003–1017.
- Will B, Dalrymple-Alford J, Wolff M, Cassel J-C. 2008. Reflections on the use of the concept of plasticity in neurobiology. Translation and adaptation by Bruno Will, John Dalrymple-Alford, Mathieu Wolff and Jean-Christophe Cassel from J. Paillard, *J Psychol* 1976;1:33-47. *Behav Brain Res.* 192:7–11.
- Willcockson H, Valtschanoff J. 2008. AMPA and NMDA glutamate receptors are found in both peptidergic and non-peptidergic primary afferent neurons in the rat. *Cell Tissue Res.* 334:17–23.

- Willcockson H, Valtschanoff J. 2009. AMPA and NMDA glutamate receptors are found in both peptidergic and non-peptidergic primary afferent neurons in the rat. *Cell Tissue Res.* 334:17–23.
- Williams MN, Zahm DS, Jacquin MF. 1994. Differential foci and synaptic organization of the principal and spinal trigeminal projections to the thalamus in the rat. *Eur J Neurosci.* 6:429–453.
- Woodbury CJ, Kullmann FA, McIlwrath SL, Koerber HR. 2008. Identity of myelinated cutaneous sensory neurons projecting to nociceptive laminae following nerve injury in adult mice. *J Comp Neurol.* 508:500–509.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. 1992. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature.* 355:75–78.
- Woolf CJ, Shortland P, Reynolds M, Ridings J, Doubell T, Coggeshall RE. 1995. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J Comp Neurol.* 360:121–134.
- Woolsey TA, Van der Loos H. 1970. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res.* 17:205–242.
- Wright N, Glazewski S, Hardingham N, Phillips K, Pervolaraki E, Fox K. 2008. Laminar analysis of the role of GluR1 in experience-dependent and synaptic depression in barrel cortex. *Nat Neurosci.* 11:1140–1142.
- Xerri C. 2012. Plasticity of cortical maps: multiple triggers for adaptive reorganization following brain damage and spinal cord injury. *Neuroscientist.* 18:133–148.
- Yang L, Zhang FX, Huang F, Lu YJ, Li GD, Bao L, Xiao HS, Zhang X. 2004. Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord. *Eur J Neurosci.* 19:871–883.
- Yoshida A, Dostrovsky JO, Sessle BJ, Chiang CY. 1991. Trigeminal projections to the nucleus submedius of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol.* 307:609–625.
- Yoshida A, Sessle BJ, Dostrovsky JO, Chiang CY. 1992. Trigeminal and dorsal column nuclei projections to the anterior pretectal nucleus in the rat. *Brain Res.* 590:81–94.
- Zhang Y, Chen Y, Liedtke W, Wang F. 2015. Lack of Evidence for Ectopic Sprouting of Genetically Labeled A β Touch Afferents in Inflammatory and Neuropathic Trigeminal Pain. *Mol Pain.* 11:s12990-015–0017.
- Zhu JJ, Esteban J a, Hayashi Y, Malinow R. 2000. Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci.* 3:1098–1106.
- Zuo Y, Yang G, Kwon E, Gan W-B. 2005. Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature.* 436:261–265.